

**Untersuchung zur Exzision und zielgerichteten Integration  
in Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Zitterpappelhybriden  
(*Populus tremula* L. x *P. tremuloides*) mit dem  
FLP/*FRT*-Rekombinationssystem**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades

**DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

– Dr. rer. nat. –

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Tobias M. H. Schenk**

geboren am 02.02.1977 in Würzburg

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. H. LÖRZ  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. U. WIENAND  
Tag der Disputation: 05. Dezember 2008

Hamburg, den 14. November 2008



| *Jörg Ganzhorn*

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

*„Natura semina nobis scientiae dedit,  
scientiam non dedit.”*

(Seneca, Epistulae morales 120,4)

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Gentechnik bei transgenen Nutzpflanzen vs. klassische Züchtung.....	1
1.2 Vermeidung von Positionseffekten durch zielgerichtete Integration.....	4
1.3 Markergeneliminierung.....	6
1.4 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme .....	8
1.5 Verwendete Strategie für die Exzision und Integration .....	12
1.6 Zielsetzung .....	15
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Chemikalien .....	16
2.1.2 Medien.....	16
2.1.3 Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.4 Pflanzen.....	18
2.1.5 Bakterienstämme .....	18
2.1.6 Vektoren .....	18
2.1.7 Oligonukleotide .....	20
2.1.8 Größenstandards und Sonden.....	22
2.1.9 Software und Datenbanken .....	22
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA.....	23
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA .....	23
2.2.1.2 Restriktion von DNA.....	23
2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
2.2.1.4 Southern Blot.....	27
2.2.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA.....	27
2.2.2.1 Isolierung von RNA.....	27
2.2.2.2 RT-PCR zum Nachweis von mRNA der FLP-Rekombinase .....	28
2.2.2.3 Northern Blot.....	28
2.2.3 Transformation von Pflanzenmaterial .....	28
2.2.3.1 Biolistische Transformation von unreifen Weizenembryonen.....	28
2.2.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation von Zitterpappel.....	29
2.2.4 Aktivierung des Gmhsp17.5-E Promotors .....	30
2.2.5 GUS-Färbung von Blattmaterial .....	30
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>

<b>3.1</b>	<b>Expression der Promotor-Gusi-AM Konstrukte.....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Promotorisolierung und -Klonierung .....	32
3.1.2	Induzierung der Promotor-Gusi-AM Konstrukte .....	33
<b>3.2</b>	<b>Klonierung der Transformationsvektoren.....</b>	<b>38</b>
3.2.1	Exzisionsvektoren .....	38
3.2.2	Integrationsvektoren.....	39
<b>3.3</b>	<b>Transformationsexperimente .....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Transformation von Weizen.....	41
3.3.2	Transformation von Zitterpappel .....	42
<b>3.4</b>	<b>Exzision .....</b>	<b>44</b>
3.4.1	Nachweis der Integration des Exzisionskonstrukts .....	44
3.4.1.1	Weizen.....	44
3.4.1.2	Zitterpappel.....	45
3.4.2	Nachweis der Exzision durch GUS-Färbung .....	46
3.4.2.1	Weizen.....	47
3.4.2.2	Zitterpappel.....	47
3.4.3	Nachweis der Exzision durch PCR-Analysen bei Weizen und Zitterpappel .....	48
3.4.4	Nachweis der Exzision durch Sequenzanalysen bei Weizen und Zitterpappel....	49
3.4.5	Transkriptionsanalyse der FLP-mRNA bei Weizen.....	50
3.4.6	Nachweis der Exzision durch Southern Blot Analysen bei Zitterpappel .....	52
<b>3.5</b>	<b>Integration.....</b>	<b>53</b>
3.5.1	Transgennachweis der Integrationskonstrukte bei Zitterpappel.....	53
3.5.2	Aktivierung der FLP-Rekombinase in doppeltransgenen Zitterpappellinien .....	55
3.5.3	Nachweis der Integration durch PCR-Analysen .....	57
3.5.4	Sequenzanalysen des modifizierten Integrationskonstrukts.....	60
3.5.5	Analyse der genomischen Insertionsorte bei Zitterpappel .....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
4.1	Promotorstudien .....	63
4.2	Exzision des Markergens <i>nptII</i> .....	67
4.3	Integration des <i>bar</i> -Gens .....	72
4.4	Ausblick .....	77
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

[ <sup>32</sup> P]-dATP	radioaktiv-markiertes Desoxyadenosintriphosphat
[ <sup>32</sup> P]-dCTP	radioaktiv-markiertes Desoxycytosintriphosphat
35S	Promotor der 35S rRNA des CaMV
601HBC	Medium mit Hygromycin, Basta <sup>®</sup> und Cefotaxim zur Selektion
601KC	Medium mit Kanamycin und Cefotaxim zur Selektion
601KHC	Medium mit Kanamycin, Hygromycin und Cefotaxim zur Selektion
<i>Ac</i>	<i>Actiator</i> , autonomes transponierbares Element aus Mais
<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>attB</i>	bakterielle <i>attachment site</i> (Erkennungsequenz)
<i>attP</i>	Phagen <i>attachment site</i> (Erkennungsequenz)
<i>bar</i>	Gen der Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferase aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> , Basta <sup>®</sup> -Resistenzgen
bzw.	beziehungsweise
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (Blumenkohl Mosaikvirus)
cDNA	komplementäre DNA
COR	Coronatin
Cre	<i>cyclization recombination</i> (Cre-Rekombinase)
<i>cryIII</i> A	Gen des (Kristall-) $\delta$ -Endotoxins aus <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>cry</i> : <i>crystal</i>
CSPD	Disodium 3-(4-meth-oxyspiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan)-4-yl) phenyl Phosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Ds</i>	<i>Dissociation</i> , nicht-autonomes transponierbares Element aus Mais
DIG	Digoxygenin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSP	<i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> -Toxin, ein Derivat der Okadainsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Esch5	Klon eines Zitterpappelhybrids ( <i>Populus tremula</i> L. x <i>P. tremuloides</i> )
EPSP	Gen der Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase
EU	Europäische Union
FLP	<i>flipping</i> DNA (FLP-Rekombinase)
FLPase	FLP-Rekombinase
FLPe	<i>enhanced</i> FLP-Rekombinase
<i>FRT</i>	FLP <i>Recognition Target</i> ( <i>FRT-site</i> ; Erkennungssequenz der FLPase)
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein

Gmhsp17.5-E	Hitzeschockpromotor aus der Sojabohne ( <i>Glycine max</i> )
Gin	<i>G inversion</i>
<i>gix</i>	Erkennungssequenz der Gin-Rekombinase
GUS	$\beta$ -Glukuronidase
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
<i>hpt</i>	Gen der Hygromycinphosphotransferase, Hygromycin-Resistenzgen
HS	Hitzeschock
HSE1	Hitzeschockelement 1
HSF	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor
HSP	Hitzeschockpromotor
Hsp82B	Hitzeschockpromotor aus Reis ( <i>Oryza sativa</i> L.)
IPCR	<i>Inverse</i> PCR
<i>ipt</i>	Gen der Isopentenyltransferase
<i>lox/ loxP</i>	<i>Locus of crossing over (X) of Bacteriophage P1</i> (der Cre-Rekombinase)
MCS	Multiple Cloning Site
NOS	Terminator des Nopalinsynthasegens aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>nptII</i>	Gen der Neomycinphosphotransferase, Kanamycin-Resistenzgen
OCS	Terminator des Octopinsynthasegens aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>pat</i>	Basta <sup>®</sup> -Resistenzgen aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	Rekombinase des Hefe-Rekombinationssystem
<i>RS</i>	<i>Recognition Site</i> von R (Erkennungssequenz)
RecQ	Rekombinationsprotein Q, ATP-abhängige DNA-Helicase aus <i>E. coli</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
StLS1	Intron des LS1-Gens aus Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> )
T35S	Terminator der 35S rRNA des CaMV
T-DNA	Transfer-DNA
<i>uidA / gus</i>	Gen der $\beta$ -Glukuronidase (GUS)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs.	versus
wcs120	<i>wheat cold associated</i> , kälteinduzierbarer Promotor aus Weizen
wt	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronsäure
z. B.	zum Beispiel

Physikalische Größen und Konstanten wurden nach dem SI-System („Systeme International d’Unites“, 2.7.1969) abgekürzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Gentechnik bei transgenen Nutzpflanzen vs. klassische Züchtung

Bis in die Mitte der 80er Jahre gab es außer den klassischen Züchtungsverfahren keine anderen etablierten Methoden zur Beeinflussung von Pflanzeigenschaften. Etablierte Methoden waren z. B. das Auslösen von Polyploidie durch Kälte- oder Colchizin-Behandlung während der Meiose und die Mutationszüchtung durch Bestrahlung von pflanzlichen Genomen mit Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung (Kuckuck *et al.*, 1985). Die Züchtungsprozesse beruhten dabei auf der Kombination vorteilhafter Gene (Kreuzung) und auf der Selektion solcher Pflanzen, die diese vorteilhaften Gene enthielten. Mitte der 80er Jahre erfuhr die klassische Züchtung eine Erweiterung durch die ersten gentechnischen Methoden bei Pflanzen. So konnten 1983 durch Transformation von Tabakpflanzen mit einem Antibiotikaresistenz-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* erstmals transgene (gentechnisch veränderte) Pflanzen erzeugt werden (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Murai *et al.*, 1983). Die gentechnischen Methoden zur Übertragung von DNA, die dabei hauptsächlich Anwendung finden, sind der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer, die biolistische Transformation und die chemische oder elektrische Behandlung von Einzelzell- oder Protoplastenkulturen (Newell, 2000; Trigiano und Gray, 2004). Im Gegensatz zur traditionellen klassischen Züchtung ist es mit diesen gentechnischen Methoden erstmals ausschließlich möglich, gezielt erwünschte Gene in eine Pflanze einzubringen und unerwünschte Eigenschaften zu unterbinden. Die Gentechnik ermöglicht es sogar, genetische Eigenschaften artübergreifend in den gewünschten Zielorganismus einzubringen (Saedler und Schuchert, 2001). Ein weiterer Unterschied zur traditionellen Züchtung besteht darin, dass die Veränderungen rascher und effizienter ausgelöst werden können.

Die erste in Deutschland freigesetzte gentechnisch veränderte Pflanze, eine Petunie (*Petunia*), wurde 1989 in Köln am Max-Planck-Institut hergestellt (Meyer, 1995, 1996). Die erste transgene Nutzpflanze, eine virusresistente Zuckerrübe, wurde 1993 in Deutschland freigesetzt. Kurz danach wurde in den USA mit der „FlavrSavr“-Tomate der Firma Calgene erstmals ein gentechnisch veränderter Organismus als Lebensmittel zugelassen. Die gentechnischen Veränderungen gingen dabei auf Arbeiten der britischen Arbeitsgruppe von Smith *et al.* (1988) zurück. Sie brachten das Polygalakturonidase-Gen, ein Enzym das die Zellwand der Pflanze angreift, in *antisense* Orientierung in das Pflanzengenom ein, was zu



einer Inhibierung des endogenen Enzyms und somit zu einer verbesserten Lagereigenschaft führte. Im Fokus der modernen Pflanzenzüchtung steht neben der Entwicklung von ertragreicheren Sorten hauptsächlich die Etablierung von Pflanzensorten, die Resistenzen gegen bestimmte Krankheitserreger besitzen, wie z. B. Schutz vor Insekten (Moeser, 2006), Resistenz gegen pilzliche Krankheiten (Stahl, 2006) und Viren (Varrelmann, 2006) oder Herbizidtoleranzen (Schuette und Schmitz, 2001; Maerlaender und Tiedemann, 2006).

Eine bekanntes Beispiel zur Steigerung des Fraßschutzes von Insekten in Kulturpflanzen sind die *Bt*-Gene des *Bacillus thuringiensis*. Durch Transformation der *Bt*-Gene in Mais wurde der Befall des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) um bis zu 30% reduziert. Ebenfalls konnten Baumwollpflanzen durch die Integration der *Bt*-Gene gegen die am häufigsten auftretenden Schädlinge der Baumwolle, dem Baumwollkapselwurm (*Helicoverpa zea*), Roter Kapselwurm (*Pectinophora gossypiella*) und der Baumwolleule (*Heliothis virescens*) resistent gemacht und der Befall dieser Pflanzen deutlich vermindert werden. Auch *Bt*-transgene Pappelpflanzen werden seit einigen Jahren in chinesischen Plantagen angebaut. Das Holz der Pappelbäume ist für die Papierindustrie von enormer Bedeutung, da Pappelbäume sehr schnell wachsen und gute Holzeigenschaften aufweisen. Im Zusammenhang mit den *Bt*-Genen ist die Gruppe der pflanzeneigenen Protease-Inhibitoren zu erwähnen, welche zwar die Proteasen von verschiedenen Insekten hemmen, nicht jedoch die eigenen (Blatter und Wolfe, 1995). Eine weit verbreitete Anwendung zur Vermeidung von Pilzkrankheiten ist der Einsatz von Chitinasen, welche die Polysaccharide der pilzlichen Zellwand abbauen (Anke und Thines, 2006). Der Ansatz sieht eine Stärkung der pflanzeneigenen Abwehrmechanismen vor, indem die der Pathogenabwehr zugehörigen Proteine, wie Chitinasen und Glucanasen, in die Pflanzen transferiert werden und so eine frühere und stärkere Abwehr des Pilzbefalls ermöglichen soll (Schulze-Lefert und Panstruga, 2003). Diese Methodik findet u.a. Anwendung bei transgenen Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* L.), welche auf diese Weise eine höhere Resistenz gegen Fusarium-Pilze aufweisen oder bei Raps (*Brassica napus*) gegen den Erreger der Rübenfäule *Rhizoctonia solani*. Arbeiten von Zhu *et al.* (1996) zeigten eine andere Möglichkeit Pilzbefall zu bekämpfen: Transgene Kartoffeln (*Solanum commersonii* Dun.), welche die *sense* oder *antisense* RNA eines osmotin-ähnlichen Proteins unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, wiesen eine höhere Toleranz gegenüber dem Pilz *Phytophthora infestans* auf.

Weitere Anwendungsgebiete umfassen die gentechnische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten, welche von Bakterien oder Viren übertragen werden. So werden beispielsweise durch gezielte Expression von Lysozymen aus dem Bakteriophagen T4 Apfelsorten gegen den bakteriellen Erreger des Feuerbrands *Erwinia amylovora* geschützt. Ebenfalls wird in Kartoffeln mit dieser Strategie eine erhöhte Toleranz gegen das Bodenbakterium *Erwinia carotovora* erreicht (Sijahril *et al.*, 2006). Gegenüber pflanzlichen Viruskrankheiten wird häufig die RNA-Doppelstrang vermittelte Gen-Interferenz (RNAi) Methode verwendet (Campbell *et al.*, 2002; Leung und Whittaker, 2005). Dazu werden Teile viruseigener Gene oder dazu homologer Gensequenzen in die Pflanze eingebracht, die im Falle eines tatsächlichen Virusbefalls mit der entsprechenden RNA-Matrize des Virus einen RNA-Doppelstrang bilden, welcher von zelleigenen Exonukleasen abgebaut werden (Stiekema *et al.*, 1993).

Ein großes Forschungs- und Anwendungsfeld ist die Kombination von Herbizidwirkstoffen und transgenen Pflanzen, die gegen diesen Wirkstoff resistent sind. Die zwei wichtigsten unselektiven Herbizidwirkstoffe hierbei sind Glyphosat (Roundup<sup>®</sup>, Monsanto, USA, (Comai *et al.*, 2005) und Glufosinat (Basta<sup>®</sup>). Mittlerweile wird in zahlreichen Sorten weltweit diese transgene Herbizidtoleranz in der Praxis eingesetzt. Basta<sup>®</sup> (Phosphinothricin) hemmt die Glutaminsynthetase, was in der Pflanzenzelle zu einer Anreicherung von Ammoniak führt, da dessen Abbau zu Glutamin gehemmt ist, und bei ausreichender Konzentration zum Absterben der Pflanze führt. Das *pat*-Enzym aus *Streptomyces viridochromogenes*, welches die Phosphinothricin-N-Acetyltransferase kodiert, befähigt nun die transgene Pflanze das Phosphinothricin durch Acetylierung zu inaktivieren und somit gegen Basta<sup>®</sup> resistent zu sein. Das *pat*-Gen oder auch sein Analog, das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, findet bereits in transgener Gerste (*Hordeum vulgare*), Luzernen (*Medicago sativa*), Mais (*Zea mays*), Raps (*Brassica napus*), Reis (*Oryza sativa*), Sojabohne (*Glycine max*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) Anwendung. Eine andere Strategie ermöglicht es der transgenen Pflanze eine modifizierte Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP-Synthetase) auszubilden. Die Bindung des Glyphosats an diese strukturell modifizierte EPSP-Synthetase hat jedoch, im Gegensatz zur nativen EPSP-Synthetase, keine Blockierung des aktiven Zentrums zur Folge und so kann die modifizierte EPSP-Synthetase den Shikimatweg zur Bildung lebenswichtiger aromatischer Aminosäuren aufrecht halten, was ihr eine Resistenz gegenüber dem Roundup<sup>®</sup> verschafft. (Kishore und Shah, 1988; Lydon und Duke, 1999; Vries *et al.*, 2003).

Neben den hier aufgeführten Beispielen von gentechnisch eingebrachten Resistenzen haben andere Forschungen die Verbesserung bestimmter Produkteigenschaften zum Ziel. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der „Golden Rice“, eine transgene Reissorte mit erhöhtem Provitamin A-Gehalt (Beyer *et al.*, 2002). Durch den Transfer von zwei artfremden Enzymen (*psy* und *crtI*) für den  $\beta$ -Carotinoidstoffwechsel wurde die Bildung von  $\beta$ -Carotin im Endosperm ermöglicht.  $\beta$ -Carotin wird für die Vitamin A-Bildung im Körper benötigt. Durch den Verzehr von „Golden Rice“, vor allem in Regionen der Erde mit weit verbreitetem Vitamin A Mangel könnten die daraus resultierenden Krankheits- und Sterbefälle, vor allem bei Kleinkindern, zu einem hohen Prozentsatz verhindert werden.

Obwohl seit Mitte der 80er Jahre umfangreiche Anstrengungen unternommen worden sind, die Transformationstechnik auch auf verschiedene Getreide- und Baumarten zu übertragen (Fillatti *et al.*, 1987; Confalonieri *et al.*, 1994; Fladung *et al.*, 1997; Hansen und Wright, 1999; Han *et al.*, 2000; Igasaki *et al.*, 2000), konnte die Effizienz des Transformationsprozesses selbst noch nicht ausreichend gesteigert werden. Die Integration des Transgens in das Pflanzengenom erfolgt nach wie vor, sowohl bei der biolistischen als auch bei der Agrobakterien-vermittelten Transformation, zufällig sowie in unvorhersehbarer Kopienanzahl und ist häufig als Transgen-Wiederholung festzustellen, was zu einem Zusammenbruch der Transgenexpression führen kann (Stam *et al.*, 1997; Kohli *et al.*, 1999; Kooter *et al.*, 1999; Kumar und Fladung, 2000a, b, 2001a, 2002). Ebenfalls spielen sogenannte Positionseffekte eine sehr wichtige Rolle für die Stabilität der Transgenexpression.

### **1.2 Vermeidung von Positionseffekten durch zielgerichtete Integration**

Das Gelingen der Herstellung stabil transformierter Pflanzen und die zuverlässige Expression des Transgens hängen also wesentlich vom Insertionsort des Transgens in das Zielgenom ab. So wird die Höhe der Expression eines Gens nicht nur von den unmittelbar mit ihm verbundenen regulatorischen Elementen, wie Promotor- oder Enhancerelementen beeinflusst, sondern auch von seiner Position im Genom (Positionseffekte). In der Organisation des Genoms gibt es Bereiche in denen viele Gene kodiert sind, das Euchromatin, und Bereiche, in denen weniger transkriptionell aktive Bereiche zu finden sind, das Heterochromatin (Dimitri *et al.*, 2005). Je nachdem wo das Transgen in das Genom inseriert wird, kann auch seine Expression nachhaltig beeinflusst werden. Ein weiterer Faktor ist die Organisation der

Chromosomen im Zellkern. Im Inneren Bereich des Chromosoms sind vorwiegend nicht-kodierende DNA und repetitive Elemente angeordnet, während die kodierende DNA sich meist an der Peripherie des Chromosoms befindet (Taddei *et al.*, 2004). Auch Copenhaver *et al.* (1998) stellt fest, dass abgesehen vom Einfluss auf die Expression die Position eines Gens im Genom auch deshalb wichtig ist, weil es auf den Chromosomen Orte mit hohem und niedrigem Rekombinationspotential gibt, sogenannte „*hot and cold spots*“. Gerade dies hat unmittelbaren Einfluss auf die dauerhafte und stabile Insertion von Transgenen. Vor allem bei langlebigen Bäumen ist es daher wichtig, den favorisierten Insertionsort zu bestimmen.

Darüber hinaus gibt es in allen Eukaryoten spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Scaffold- oder Matrix-Attachment Regionen, die an die nukleäre Matrix binden, einem Netzwerk aus Proteinfasern, die den Zellkern durchziehen (Allen *et al.*, 2000). Sie können zwischen 300 bp und mehreren Kilobasenpaaren lang sein und werden häufig als *cis*-agierende Elemente gesehen, die außerhalb der transkribierten Regionen und innerhalb von Introns gefunden werden. Unter bestimmten Umständen erhöhen sie die Transkription (Rudd *et al.*, 2004), was abermals bedeutet, dass die Höhe der Genexpression nicht nur vom lokalen Promotor und Enhancer abhängen kann (Bode *et al.*, 2003).

Des Weiteren können Methylierungen der DNA die Transkription und die Synthese der mRNA beeinflussen (Matzke *et al.*, 1989, 1993). Häufig tritt das in Pflanzen mit GC-reichen Sequenzen auf, in denen die Aminosäure Cytosin an ihrem 5'-Kohlenstoffatom methyliert (Meyer *et al.*, 1993; Meyer, 1996; Matzke und Matzke, 1998; Mittelsten Scheid *et al.*, 1998; Matzke *et al.*, 2000). In GC-reichen Bereichen sind häufig auch Genen, bzw. deren Promotorsequenzen lokalisiert (Jones und Takai, 2001). Da die Methylierung des Cytosins auch die Chromatinstruktur beeinflusst, ist sie oft am sogenannten „Gene Silencing“ (Vaucheret *et al.*, 1998), also an der transkriptionellen Stilllegung von Genen, beteiligt. Ebenso kann die Integration des Transgens in die Nähe von kodierenden Regionen Mutationen verursachen (Kumar und Fladung, 2001a). Oder die Insertion der häufig verwendeten stark aktiven konstitutiven Promotoren der Transgenkonstrukte können unerwartet auf den endogenen Stoffwechsel Einfluss nehmen, was jedoch nur sehr aufwendig nachzuweisen ist (Kuiper *et al.*, 2001).

Zur gezielten Integration von Transgenen, und damit zur Vermeidung von Positionseffekten, könnte auch der Mechanismus der homologen Rekombination eingesetzt werden (Paszkowski

*et al.*, 1988; Puchta und Hohn, 1991; de Groot *et al.*, 1992; Puchta *et al.*, 1992; Offringa *et al.*, 1993; de Groot *et al.*, 1994; Gallego *et al.*, 1999), wie es schon seit einiger Zeit sehr erfolgreich bei Bakterien, Hefen und in embryonalen Stammzellen von Mäusen angewendet wird (Doetschman *et al.*, 1987; Shastry, 1994). Jedoch liegen die erzielten Frequenzen der homologen Rekombination bei Pflanzen weit unter den Frequenzen, die bei Bakterien oder Mauszellen erreicht werden konnten (Puchta, 1998; Hohn und Puchta, 1999; Vergunst und Hooykaas, 1999). So ist die routinemäßige Anwendung homologer Rekombination zur Integration von Transgenen bei Pflanzen noch nicht hinreichend etabliert und stellt derzeit noch keine Alternative zur sequenz-spezifischen Rekombination dar.

Damit das Problem der Expressionsvariabilität und der Geninaktivierung nachhaltig gelöst werden kann (Fladung, 1999; Kumar und Fladung, 2000a, b, 2001a, b, 2002), ist es als umso wichtiger anzusehen, ein System zu etablieren, mit dem an zuvor festgelegten Stellen des Genoms präzise ein Transgen inserieren kann. Ein einmalig gut untersuchter Genomlocus, der nachgewiesenermaßen die fremden Gene ohne Beeinträchtigung ihrer Funktionalität aufnimmt, könnte so mit Erkennungssequenzen eines sequenz-spezifischen Rekombinationssystems versehen werden und die Insertion des Transgenkonstrukts durch die Rekombinase an diese vordefinierte Stelle erfolgen. Eine einmal hergestellte transgene Linie könnte vielfach als Ausgangslinie von Transformationen dienen. Dies soll unter anderem mit dem sequenz-spezifischen FLP/FRT-Rekombinationssystem im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### 1.3 Markergeneliminierung

Ein anderer wichtiger Aspekt, gerade im Hinblick auf die vieldiskutierte biologische Sicherheit gentechnisch veränderter (transgener) Nutzpflanzen, ist, dass bei allen hier vorgestellten Markersystemen die Gene nach ihrer Verwendung im Pflanzengenom verbleiben. Nachdem durch die Verwendung von Selektionsmarkern transgene Pflanzen identifiziert werden konnten, sind sie für die Pflanze selbst jedoch nicht mehr von Vorteil oder nötig (Hare und Chua, 2002). So könnte durch ihre nachträgliche Eliminierung oder durch den Verzicht von Antibiotika-Markergenen öffentlichen Vorbehalten begegnet werden. Außerdem würden wiederholte Transformationsansätze zum Einbringen weiterer Resistenz- oder Wunschgene möglich (Hohn *et al.*, 2001). Ein weiterer Grund für die Entfernung der nach der Selektion überflüssigen Markergene ist die Vermeidung von vertikalen Gentransfer

(Daniell, 2002; Ragan und Charlebois, 2002) wichtiger Antibiotika-Resistenzgene durch Auskreuzung in andere Pflanzen und der mögliche horizontale Gentransfer auf Bodenorganismen (Droge *et al.*, 1998, Nielsen *et al.*, 1998, 2000, 2007, Monier *et al.*, 2007, Keese, 2008). Hierfür wurden mehrere Strategien entwickelt, um selektierbare Marker in transgenen Pflanzen zu vermeiden (Puchta, 2000; Hohn *et al.*, 2001; Hare und Chua, 2002). Handelt es sich bei dem Zielorganismus um eine für Transformationstechniken gut zugängliche Nutzpflanze (z. B. Kartoffel), können Zielgensequenzen schon heute ohne Markergene übertragen werden (de Vetten *et al.*, 2003). In der Arbeit von Ebinuma *et al.* (1997) konnten durch Kombination von dem *Cre/lox*-Rekombinationssystem und dem *ipt*-Gen markergenefreie Pappelhybride erzeugt werden. Transgene Pappelhybride wurden mittels des *ipt*-Stoffwechselmarkersystems identifiziert. Nach ihrer Selektion wurde durch die *Cre*-Rekombinase eben jenes *ipt*-Markergen aus dem Genom eliminiert.

Eine andere Möglichkeit Antibiotika-Resistenzgenen zu vermeiden, ist der Einsatz von alternativen Markergenen, wie z. B. der Isopentyltransferase (Kunkel *et al.*, 1999; Negrotto *et al.*, 2000) oder der Acetohydroxysäure-Synthase (Andersson *et al.*, 2003). Nachteil bei der Anwendung solcher Stoffwechsel-Markersysteme ist, dass meist dennoch überflüssige Sequenzen in der transgenen Pflanze verbleiben und neue Markergene neu evaluiert werden müssen. Wenn es dagegen in Doppeltransformationen gelingt, Ziel- und Selektionsgene ungekoppelt in ein Genom zu übertragen, können in nachfolgenden Rückkreuzungen markergenefreie Pflanzen, die nur die gewünschten Zielgensequenzen tragen, identifiziert werden (Komari *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2001). Auch die Nutzung und Induktion der endogenen Systeme von Pflanzen zur homologen Rekombination kann zur Vermeidung von Markergenen beitragen (Zubko *et al.*, 2000; Siebert und Puchta, 2002). Des Weiteren besteht die Möglichkeit durch Einsatz spezieller Enzymsysteme wie Transposasen gezielt die Erbsubstanz zu verändern (Osborne und Baker, 1995; Ebinuma *et al.*, 1997) So konnten Osborne *et al.* (1995) in *Arabidopsis* durch die Verwendung des *Ds*-Transposons aus Mais und der *lox-site* des *Cre/lox*-Rekombinationssystems gezielt DNA ausschneiden oder inserieren. Auch durch Ko-Transformation von zwei unabhängigen T-DNAs, eine trägt den Selektionsmarker, die andere das Transgen, lassen sich durch anschließende Segregation des Transgens in der Folgegeneration markerfreie Pflanzen herstellen (Komari *et al.*, 1996; Breitler *et al.*, 2004; Miki und McHugh, 2004). De Vetten *et al.* (2003) entwickelten diesen Ansatz fort und ersetzten die zeitaufwendige Segregation der Elternpflanzen durch PCR-Analysen der Pflanzenzellen direkt nach deren Transformation und konnten so bereits in der

Elterngeneration transgene Kartoffel- (*Solanum tuberosum*) und Maniokpflanzen (*Manihot esculenta*) selektieren.

In vielen Untersuchungen werden sequenz-spezifische Rekombinationssysteme zur Entfernung von DNA-Segmenten aus einem Genom eingesetzt (Dale und Ow, 1991; O'Gorman *et al.*, 1991; Lorbach *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2001; Hoa *et al.*, 2002). Um die Pflanzen nicht einer konstitutiven, sondern nur bedarfsgerecht der Rekombinaseaktivität auszusetzen (Coppoolse *et al.*, 2003), wurden transiente Expressionssysteme entwickelt (Baubonis und Sauer, 1993; Vergunst und Hooykaas, 1998; Zuo *et al.*, 2001; Kopertekh *et al.*, 2004). Ein weiterer Ansatz die Rekombinaseaktivität in der Pflanze zu steuern, stellt die Verwendung von induzierbaren Promotoren zu externer Kontrolle der Rekombinase dar. Dieser Ansatz wird auch in dieser Arbeit angewandt (s. 3.1).

### 1.4 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme

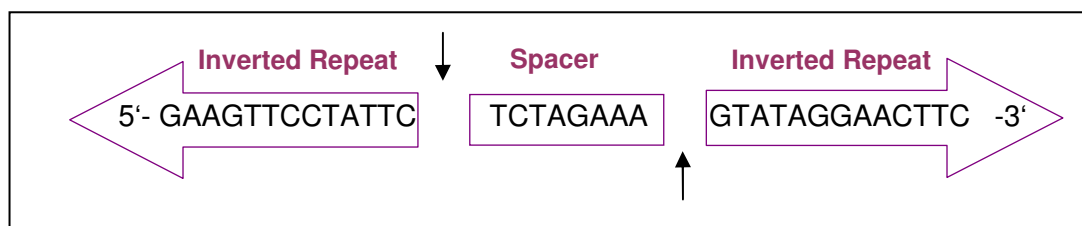
Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme können nicht nur zur Eliminierung von Markergenen, sondern auch zur zielgerichteten Integration verwendet werden. Das Grundprinzip eines einfachen sequenz-spezifischen Rekombinationssystems besteht aus zwei Erkennungsmotiven und einem Enzym, das die Rekombination an den Erkennungsmotiven katalysiert. Diese Rekombinasen werden entsprechend ihrer Funktion in Integrase (Int)- oder Invertase (Inv)-Familien oder entsprechend der Homologie ihrer Aminosäuresequenz in Serin- und Tyrosin-abhängiger Rekombinasen eingeteilt.

Zu der Inv-Familie sind z.B. die Gin-Rekombinase des Phagen Mu (Plasterk *et al.*, 1983; Maeser und Kahmann, 1991), die Plasmid-kodierte  $\beta$ -Rekombinase aus *Streptococcus pyogenes* (Diaz *et al.*, 1999) und die TnpX aus *Clostridium perfringens* (Crellin und Rood, 1997) oder die Hin-Invertase aus *Salmonella enterica* (Feng *et al.*, 1994) zu zählen.

Zur gut untersuchten Int-Familie zählen z. B. die Cre-Rekombinase (38,5 kDa) des Bakteriophagen P1 (Sternberg und Hamilton, 1981; Sternberg *et al.*, 1981a; Gilbertson, 2003), das XerC- und XerD-Rekombinationssystem aus *E. coli* (Arciszewska *et al.*, 1997) und die FLP-Rekombinase (48 kDa) aus dem 2  $\mu$  Plasmid der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Broach *et al.*, 1982; Kilby *et al.*, 1995). Der Mechanismus sequenz-spezifischer Rekombination durch Cre (Hoess und Abremski, 1985) oder FLP ist vergleichbar (Kilby *et al.*, 1993). Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass die Kristallstrukturen der katalytischen Zentren von Cre- (Guo *et al.*, 1997) und FLP (Chen *et al.*, 2000) sehr ähnlich sind. Im hoch

konservierten katalytischen Zentrum der Int-Rekombinasen befinden sich die Aminosäuren Tyrosin, Histidin und Arginin. Da ausschließlich mit dem FLP-Rekombinationssystem gearbeitet wurde, soll der Mechanismus anhand der FLPase erläutert werden.

Die FLPase katalysiert die Rekombination zwischen zwei identischen, spezifischen Erkennungssequenzen (*FRT-sites*). Diese bestehen aus einem 8 bp langen, asymmetrischen *Spacer*, der von 13bp langen *Inverted Repeats* flankiert wird, an denen die Rekombinase bindet (s. Abbildung 1). Die hier dargestellte *FRT-site* ist die Minimalsequenz die für die sequenz-spezifische Rekombination benötigt wird. Die native *FRT-site* enthält zusätzlich eine 13 bp lange Sequenzwiederholung vor dem hier dargestellten 5'-*Inverted Repeat* (Andrews *et al.*, 1986). Der *Spacer* gibt aufgrund seiner Asymmetrie der *FRT-site* die Orientierung vor (Jayaram, 1985; McLeod *et al.*, 1986) und ist Ort des DNA-Strangbruches. Der Strangbruch findet jeweils auf beiden Strängen der komplementären DNA-Doppelhelix bei FLP im Abstand von 8 bp statt (in Abbildung 1 dargestellt durch vertikale Pfeile), bei Cre im Abstand von 6 Basenpaaren.

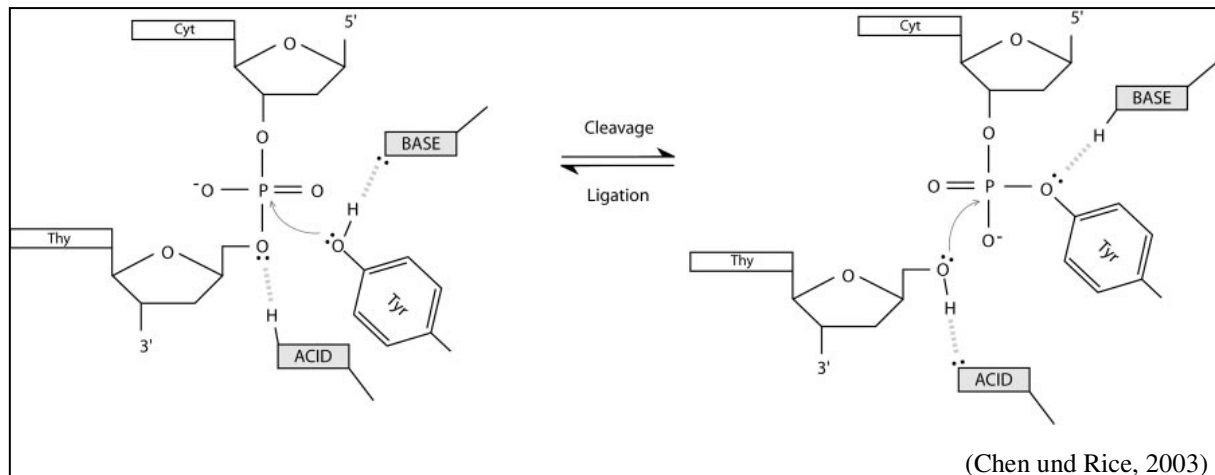


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der *FRT*-Erkennungssequenz (*FRT-site*), Nukleotidsequenz und Domänenbezeichnung.** Das Tyrosin an Position 343 der FLPase katalysiert durch nukleophilen Angriff der 5'-Hydroxylgruppe auf eine Phosphodiesterbrücke der DNA den Strangbruch zwischen dem *Inverted Repeat* und der *Spacer*-Region. Dieser Strangbruch findet auf beiden Strängen der DNA-Doppelhelix im Abstand von 8 bp statt (markiert durch Pfeile).

Zu Beginn der Reaktion binden je zwei FLP-Monomere an den *Inverted Repeats* der *FRT-site* (Ringrose *et al.*, 1998). Bei einer Rekombination zwischen zwei *FRT-sites* kommt es also zur Interaktion von vier FLP-Monomeren. Durch die Anlagerung der FLPase kommt es jeweils innerhalb der beiden *FRT-sites* zu einem nukleophilen Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes (Tyr 343) des katalytischen Zentrums auf die Phosphodiesterbrücke (s. Abbildung 2) und dadurch zum vermittelten Strangbruch zwischen dem Cytosin des *Inverted Repeats* und dem Thymin der *Spacer*-Region (Argos *et al.*, 1986). Als Resultat dieses nukleophilen Angriffs kommt es zu einer kovalenten Bindung der DNA an das 3'-Tyrosinphosphat und zur Ausbildung einer Holliday-Struktur (Lee und Gross, 1993). Dieser Vorgang findet, bei Verwendung von zwei *FRT-sites*, unabhängig voneinander an beiden

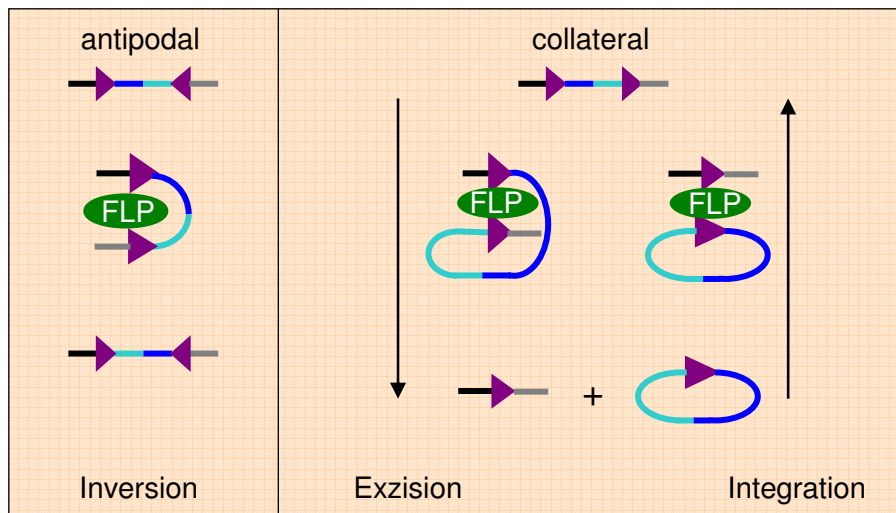


*FRT-sites* statt. Die Holliday-Struktur wird durch Wiederherstellung einer Phosphodiesterbrücke durch erneuten nukleophilen Angriff der freien 5'-Hydroxylgruppe der jeweils anderen *FRT-site* aufgelöst. Die Folge dieser Neuverknüpfung ist die Rekombination von *FRT-site* flankierenden DNA-Abschnitten.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Basen- und Säurekatalysierten DNA-Spaltung und Ligation von tyrosin-abhängigen Rekombinasen und Topoisomerasen Typ I.** Bei der DNA-Spaltung (**Cleavage**) bindet ein Proton der angreifenden Hydroxylgruppe des Tyrosins an eine Base, während eine verfügbare Säure mit dem verbleibenden 5'-Sauerstoff der leicht spaltbaren Phosphodiesterers eine Bindung eingeht. Dadurch bildet sich eine 3'-Phosphotyrosylbrücke zwischen DNA und beteiligtem Enzym. Außerdem entsteht eine freie 5'-OH Gruppe. Dieser Prozess der Protonierung und Deprotonierung lässt sich umkehren (**Ligation**).

Bei der FLP-Rekombinase findet dieser nukleophile Angriff in *trans*-Orientierung statt, d.h. die FLPase, welche auf dem kodierenden Strang der DNA bindet, katalysiert den Strangbruch des nicht-kodierenden DNA-Strangs, anders als bei Cre, welche in *cis*-Orientierung agiert (Chen und Rice, 2003). Diese *cis/trans* Organisation der Holliday-Struktur begründet auch, weshalb bei FLP/*FRT* eine größere Konformationsänderungen des DNA-Komplexes notwendig ist als bei Cre/*lox* (Shaikh und Sadowski, 2000). Beiden Rekombinasen ist gemein, dass die katalysierten Reaktionen keine Cofaktoren oder zusätzliche Energie benötigen (Van Duyne, 2001). Dieser Ablauf der Rekombination ist bei allen Mitgliedern der Tyrosin-abhängigen Integrasen ähnlich (Nunes-Duby *et al.*, 1995) und folgt im generellen dem für Topoisomerase Typ I gut bekannten Muster (Chen und Rice, 2003), s. a. Abbildung 2. Der dieser Reaktion zugrunde liegende chemische Prozess, nämlich der Protonierung und Deprotonierung einer basischen Gruppe, ausgelöst durch den nuklephilen Angriff der Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes, begründet die Reversibilität der Reaktion.



**Abbildung 3: Reaktionsschema der möglichen durch Integrasen vermittelten Rekombinationsprozesse.** In Abhängigkeit der Orientierung der *FRT-sites* sind Inversion (antipodale Orientierung) oder Exzision/Integration (collaterale Orientierung) möglich. Farbige Linien symbolisieren unterschiedliche DNA-Abschnitte, die *FRT-site* ist als lila Dreieck dargestellt.

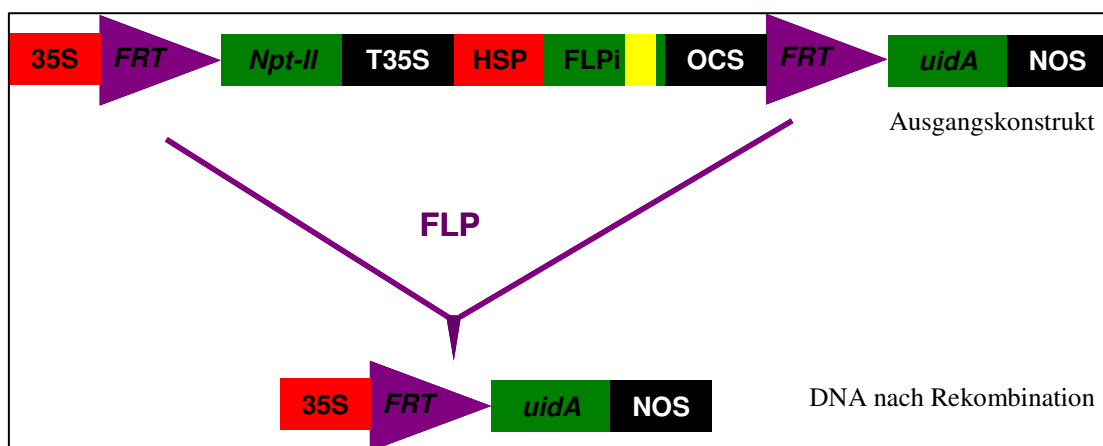
Die in Abbildung 3 dargestellte Übersicht einer enzymatischen Rekombination kann prinzipiell in zwei unterschiedliche Reaktionsabläufe eingeteilt werden, der Inversion und der Exzision/Integration. Ausschlaggebend für die ablaufende Reaktion ist die Orientierung der *FRT-sites* zueinander (s. Abbildung 3). Sind die *FRT-sites* entgegengesetzt (antipodal) orientiert, katalysiert die Rekombinase die Inversion der dazwischenliegenden DNA-Sequenz innerhalb eines Moleküls (Abbildung 3, antipodal). Sind die *FRT-sites* zueinander gleich ausgerichtet (collateral orientiert) findet eine Exzision der dazwischenliegenden DNA statt. Beide Vorgänge, die Inversion und die Exzision, stellen intramolekulare Rekombinationsprozesse dar und können ebenfalls in der entgegengesetzten Reaktionsrichtung ablaufen. Während dadurch die Inversion rückgängig gemacht wird, kann bei der Rückreaktion der Exzision eine intermolekulare Integration stattfinden (Abbildung 3, collateral; Chen und Rice, 2003).

Das natürliche Vorkommen solcher sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme ist äußerst vielseitig. Neben der Erhaltung der Kopienzahl des Bakteriophagen (*Cre/loxP*: Austin *et al.*, 1981; Sternberg *et al.*, 1981a) und der effizienten Amplifikation einer hohen Anzahl von Plasmiden (*R/RS*, *FLP/FRT*: Futcher und Cox, 1984; Futcher, 1986) sind auch die Veränderung des Wirtsspektrums (*Gin/gix*: van de Putte, 1980; Grundy und Howe, 1984) oder die Inversion eines chromosomalen Promotorelementes, dass so die Expression unterschiedlicher Flagellengene gewährleistet (*Hin-Invertase*, Kutsukake *et al.*, 2006), eine evolutionäre Erklärung für die Etablierung solcher Rekombinationssysteme in verschiedenen Organismen.

Die Vorteile des präzisen Strangbruchs und die Wiederverbindung innerhalb sehr kurzer, homologer Regionen konnten nicht nur in tierischen (Sauer und Henderson, 1988; Orban *et al.*, 1992; Sunaga *et al.*, 1997; zur Übersicht: Odell und Russell, 1994; Yu und Bradley, 2001), sondern auch in pflanzlichen Organismen erfolgreich angewendet werden (zur Übersicht: Kilby *et al.*, 1993; Odell und Russell, 1994; Ow, 2002; Nagy, 2003; Lyznik *et al.*; 2003).

## 1.5 Verwendete Strategie für die Exzision und Integration

Die Rekombinase FLP und die *FRT*-Erkennungsstellen sollen hier so angewandt werden, dass es eine Exzision von Markergenen und eine zielgerichtete Integration von Transgenen erlaubt. Für die Exzisionsstudien werden zwei collateral orientierte *FRT*-sites verwendet, die den Selektionsmarker *nptII* samt T35S-Terminator und das funktionelle FLP-Gen, bestehend aus dem Gmhsp17.5-E Promotor (HSP), die FLP-Rekombinase, welche von einem Intron unterbrochen ist (FLPi), und der Terminatorsequenz des Octopinsynthese-Gens (OCS) besteht, flankieren. Noch vor der *FRT*-site am Anfang des Konstrukts liegt der konstitutive CaMV 35S-Promotor (35S) des Blumenkohl Mosaikvirus (*Cauliflower Mosaic Virus*) und hinter der endständigen *FRT*-site liegen das promotorlose *uidA*-Gen (GUS) und der Terminator des Nopalinsynthasegens (NOS, s. Abbildung 4).

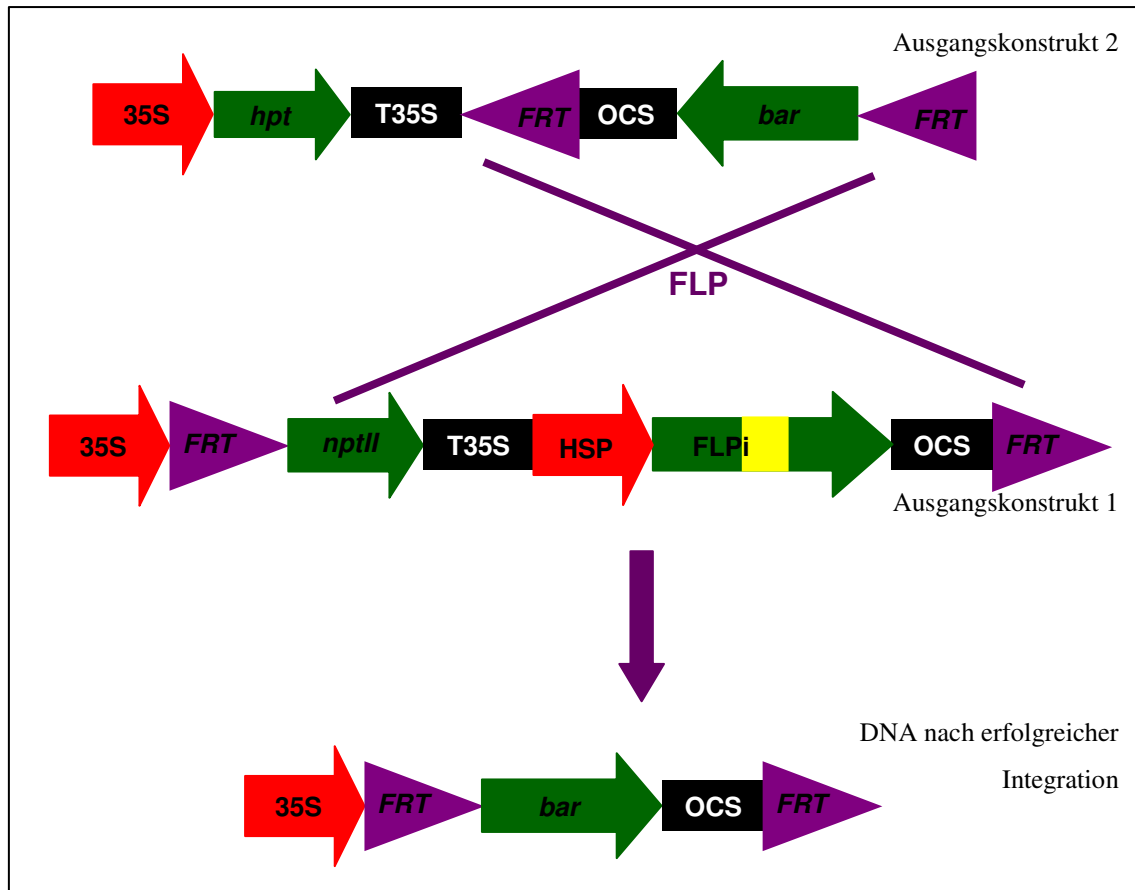


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der Exzision.** An den *FRT*-sites findet die intramolekulare Rekombination der DNA statt. 35S: 35S-Promotor, FRT: *FRT*-site, Npt-II: Kanamycin-Resistenzgen, T35S: 35S-Terminator, HSP: Gmhsp17.5-E, FLPI: FLP-Rekombinase inkl. Intron (gelb), OCS: OCS-Terminator, *uidA*: GUS-Gen, NOS: NOS-Terminator.

Durch Hitzebehandlung wird der Hitzeschock-Promotor aktiviert und das Gen der Rekombinase transkribiert, das Intron wird in den eukaryotischen Pflanzenzellen im Rahmen der cotranskriptionellen RNA-Prozessierung entfernt und es kommt zur Translation der

genetischen Information. Das FLP-Enzym erkennt die spezifischen *FRT-sites* und katalysiert die intramolekulare sequenz-spezifische Rekombination an den *FRT-sites*. Als Folge wird der von den *FRT*-Erkennungssequenzen eingerahmte DNA-Abschnitt herausgeschnitten und die zunächst entfernten voneinander gelegenen DNA-Motive bilden eine funktionelle genetische Einheit (35S-Promotor, *uidA*-Gen und NOS-Terminator). Da das zuvor promotorlose GUS-Reporter-gen ausgelöst durch die FLP-vermittelte Modifizierung der DNA unter die Kontrolle des 35S-Promotors gestellt wird, sollte nach erfolgreicher Exzision eine GUS-Aktivität nachgewiesen werden können. Auf diesem Weg lässt sich das Markergen Kanamycin nach Selektion der transgenen Pflanzen aus dem Genom entfernen.

Im Falle der Integrationsstudien werden insgesamt zwei unabhängige Konstrukte verwendet. Das eine Konstrukt besitzt ein Hygromycin-Phosphotransferase-Gen aus *E. coli* (*hpt*) und ein promotorloses *bar*-Gen, welches von zwei collateral orientierten *FRT-sites* eingegrenzt ist (s. Abbildung 5). Die Resistenz gegen Hygromycin dient als zusätzlicher Selektionsmarker und das promotorlose *bar*-Gen dient als Donor für die Integration, es stellt das „gene-of-interest“ dar, welches zielgerichtet in den Bereich des folgenden Konstrukts integriert werden soll. Das andere FLP tragende Konstrukt enthält einen DNA-Abschnitt, der von zwei collateral orientierten *FRT-sites* umgeben ist, der das *nptII*-Resistenzgen samt 35S-Terminator, den Gmhsp17.5-E Promotor, die von einem Intron *Stls1* unterbrochene FLPase und den OCS-Terminator enthält. Außerhalb der *FRT-sites* befindet sich nur der 35S-Promotor (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Abläufe während der Integration.** Die FLP-Rekombinase schneidet an den *FRT-sites* die dazwischenliegende DNA aus und integriert diese interchromosomal. 35S: 35S-Promotor, hpt: Hygromycin-Resistenzgen, T35S: 35S-Terminator, FRT: *FRT-site*, OCS: OCS-Terminator, *bar*: Basta<sup>®</sup>-Resistenzgen, NptII: Kanamycin-Resistenzgen, HSP: Gmhsp17.5-E, FLPi: FLP-Rekombinase inkl. Intron (gelb).

Durch die Hitzeaktivierung der FLPase vermittelt diese die sequenz-spezifische Rekombination an den *FRT-sites*. Dadurch kommt es zunächst zu einer Exzision beider von *FRT-sites* eingegrenzten DNA-Abschnitte. Als zweite Reaktion können diese von *FRT-sites* begrenzten DNA-Abschnitte in die noch geöffneten Erkennungssequenzen integriert werden. Als mögliches Produkt dieser interchromosomalen durch die FLP-Rekombination vermittelten Integration kann eine funktionelle *bar*-Geneinheit entstehen (s. Abbildung 5, DNA nach erfolgreicher Integration). Das zuvor promotorlose *bar*-Resistenzgen gelangt so unter die Kontrolle des 35S-Promotors und sollte so den doppeltransgenen Pflanzenlinien eine neue Resistenz gegenüber Basta<sup>®</sup> verleihen. Sollten im Rahmen dieser Arbeit Pflanzen mit einer durch diesen Rekombinationsprozess entstandenen „neuen“ Basta<sup>®</sup>-Resistenz identifiziert werden können, deutet dies daraufhin, dass mit dem FLP/*FRT*-Rekombinationssystem erfolgreich eine zielgerichtete Integration von Transgenen möglich ist.

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer praktikablen Methode zur Eliminierung von Markergenen und der zielgerichteten Integration von Transgenen mit Hilfe des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems aus Hefe.

Um die FLP-Rekombinase extern kontrollieren zu können, sollten zunächst geeignete induzierbare Promotoren gefunden und in transienten Expressionstudien auf ihre Induzierbarkeit untersucht werden. Danach sollten transgene Weizenpflanzen und Zitterpappeln erzeugt werden, die das Antibiotika-Resistenzgen *nptII* flankiert von zwei ortspezifischen *FRT*-Erkennungssequenzen sowie ein Reportergen GUS außerhalb der *FRT*-Sequenzen tragen. Des Weiteren sollte die Rekombinase FLP unter Kontrolle des zuvor getesteten induzierbaren Promotors zwischen den Erkennungssequenzen integriert werden. Nach Induzierung der FLP-Rekombinase sollte das Antibiotika-Resistenzgen eliminiert werden und das promotorlose GUS-Reportergen als Nachweis für die Exzision dienen. Zur Untersuchung der Integration sollten Pflanzen transformiert werden, die zusätzlich ein promotorloses *bar*-Gen, ebenfalls flankiert von *FRT-sites*, beinhalten. Durch die Aktivierung der FLPase sollte das promotorlose *bar*-Gen durch die sequenz-spezifische Rekombination in den Genomlocus des *nptII*- bzw. FLP-Gens integriert werden. In beiden Fällen erfolgten molekularbiologische Analysen um die Rekombination nachzuweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt, D), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (Steinheim, D).

Lösungen und Medien werden mit deionisiertem Wasser der Qualität *aqua bidest.* (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, USA) hergestellt. Nach Bedarf werden die Lösungen und Medien autoklaviert (20 min., 120°C, 2x10<sup>5</sup> Pa) oder sterilfiltriert (MillexGP Porendurchmesser 0,22 µm, Millipore, Bedford, USA oder Porendurchmesser 0,25 µm, Schleicher und Schüll, Dassel, D). Allgemein gebräuchliche molekularbiologische Lösungen werden nach (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt.

#### 2.1.2 Medien

Folgende allgemeine Grundmedien werden für die Kultivierung und Selektion der Weizen- und Zitterpappelgewebekulturen verwendet. Das dafür benötigte MS<sup>-</sup> Medium wird nach Becker (Universität Hamburg, nicht publiziert) hergestellt.

MS<sup>-</sup> Ind. (2x, für Induktionsmedium) für 1L:                      pH 5,7 → sterilfiltrieren

200ml MS<sup>-</sup> Macrosalze (10x)

2ml MS<sup>-</sup> Microsalze (1000x)

4ml FeNa-EDTA (500x)

60g/l Saccharose

pH 5,7 → sterilfiltrieren

Induktionsmedium I:

200ml 2x MS<sup>-</sup> Ind.

200ml 0,6% 2x Gelrite

800µl 2,4D (mg/ml)

MS<sup>-</sup> Osm. (2x, für osmotisches Medium)

für 1L:

200ml MS<sup>-</sup> Macrosalze (10x)

2ml MS<sup>-</sup> Microsalze (1000x)

4ml FeNa-EDTA (500x)

479,22g/l Saccharose

Osmotisches Medium:

100ml 2x MS<sup>-</sup> Osm.

100ml steriles H<sub>2</sub>O

200ml 0,6% 2x Gelrite

### Selektionsmedium II:

200ml 2x MS<sup>-</sup> Ind.  
200ml 0,6% 2x Gelrite  
800µl 2,4D (mg/ml)  
600µl Kanamycin (150mg/ml)

### Selektionsmedium III:

200ml 2x MS<sup>-</sup> Ind.  
200ml 0,6% 2x Gelrite  
40µl 2,4D (mg/ml)  
600µl Kanamycin (150mg/ml)

### Regenerationsmedium 1/2:

100ml 2x MS<sup>-</sup> Ind.  
100ml steriles H<sub>2</sub>O  
200ml 0,6% 2x Gelrite

### 460 Medium (MS<sup>-</sup>) 1L:

2,46g WPM-Pulver (White's Basal Salt Mixture) (White, 1943)  
20g Saccharose  
7,5g Agar  
autoklavieren

### 601 Medium 1L:

1L 460 Medium  
1ml Pluronic F-68  
10µl Thidiazuron

### 2.1.3 Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, *Taq*-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase werden von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) bezogen. Die zugehörigen Arbeitspuffer sind stets mitgeliefert und verwendet worden. DIG-[11]-dUTP (alkali-labil), Antikörper Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragmente und CSPD werden von Roche (Mannheim, D) bezogen.

Es wird das TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen sind folgende Kits angewendet worden:

NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit<sup>®</sup> von Macherey-Nagel (Düren, D),

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit von Avegene (Taipei, Taiwan),

Agarose Gel DNA Extraction Kit von Roche (Mannheim, D).

Es werden Nylonmembranen und Röntgenfilme von Amersham Biosciences Europe (Freiburg, D) und Blotting Papier von Schleicher und Schüll (Dassel, D) nach Angaben der Hersteller verwendet.



### 2.1.4 Pflanzen

Für die Experimente kommen Weizen (*Triticum aestivum* L., Winterweizen, Genotyp „Florida“) und Hybride der Zitterpappel (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides*, Klon: Esch5) zum Einsatz. Die Weizenkeimlinge werden acht Wochen nach Aussaat in Einheitserde unter Kurztag-Bedingungen (4°C/2°C Tag/Nacht), 6 Stunden Licht (4.000 Lux) kältebehandelt. Nach der Vernalisation werden die Weizenpflanzen im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen bei 18°C/13°C (Tag/Nacht) und 16 Stunden Licht (24.000 – 25.000 Lux) angezogen.

Zitterpappeln werden vollständig in Gewebekultur in einer Klimakammer unter kontrollierten Langtag-Bedingungen bei 25°C kultiviert.

### 2.1.5 Bakterienstämme

Zur Klonierung der Transformationsvektoren werden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme XL1Blue (Bullock *et al.*, 1987) und DH5 $\alpha$ -T1 (Hanahan, 1983) eingesetzt. Die Transformation erfolgt nach Inoue *et al.*, (1990). Die Bakterien werden bei 37°C auf LB-Medium kultiviert (Miller, 1972). Die Selektion transformierter Stämme erfolgte entsprechend dem Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin.

Die Anzucht des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101 pMP90RK (Koncz *et al.*, 1989) erfolgt in LB-Medium bzw. auf LB-Platten bei 28°C unter Zusatz von 100  $\mu$ g/ml Rifampicin, 10  $\mu$ g/ml Gentamycin und 100  $\mu$ g/ml Kanamycin. Die Transformation kompetenter Agrobakterien (Hofgen und Willmitzer, 1988) geschieht nach Zugabe von 1  $\mu$ g Vektor-DNA zu 200  $\mu$ l kompetenter Agrobakterien. Die Suspension wird auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Danach wird 1 ml LB-Medium zugesetzt und die Zellen für mindestens 4 Stunden bei 28°C und 125 rpm geschüttelt. Schließlich wird der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit je 100  $\mu$ g/ml Kanamycin, Rifampicin und 10  $\mu$ g/ml Gentamycin ausplattiert und bei 28°C für 2-3 Tage in Dunkelheit inkubiert.

### 2.1.6 Vektoren

Zur Klonierung, als PCR-Matrizen, als Positivkontrollen und zur Transformation von Pflanzen wurden folgende Vektoren verwendet, die soweit nicht anders angegeben von Hermann Schmidt (DNA-Cloning Service, Hamburg, D) kloniert wurden und das *amp*-Resistenzgen enthalten.

- pGusi-AM** Der modifizierte pUC-Vektor (5,3 kb) enthält hinter der Multiple Cloning Site (MCS) das promotorlose  $\beta$ -Glukuronidasegen *uidA* (GUS) aus *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986) und den Terminator des Nopalinsynthasegens (NOS) aus *Agrobacterium tumefaciens* (Dhaese *et al.*, 1983). Das GUS-Gen enthält zusätzlich das Intron StLS1 (Vancanneyt *et al.*, 1990).
- pWcs120-Gusi-AM** Enthält den kälteinduzierbaren Promotor wcs120 aus Weizen (NCBI: AY493570), vor dem GUS-Gen des pGusi-AM-Vektors.
- pHsp82B-Gusi-AM** Enthält den hitzeinduzierbaren Promotor Hsp82B aus Reis (NCBI: Z11920), vor dem GUS-Gen des pGusi-AM-Vektors.
- pGmhsp17.5-E-Gusi-AM** Enthält den hitzeinduzierbaren Promotor Gmhsp17.5-E (NCBI: 28070.1) aus der Sojabohne, vor dem GUS-Gen des pGusi-AM-Vektors.
- pTex** Der Vektor (7,7 kb) trägt das Exzisionskonstrukt, bestehend aus der Neomycinphosphotransferase II (*nptII*), welches zwischen 35S-Promotor und 35S-Terminator des *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) liegt. Das FLP-Rekombinasegen aus Hefe wird von dem Intron StLS1 unterbrochen und liegt zwischen einem hitzeinduzierbaren Promotor (HSP) und dem Terminator des Octopinsynthasegens (OCS) aus *Agrobacterium tumefaciens* (Fujimoto *et al.*, 1993). Außerdem enthält es das promotorlose GUS-Gen mit der Terminatorsequenz der Nopalinsynthetase (NOS). Die *FRT-sites* flankieren *nptII*, T35S, HSP, FLP und OCS. Außerhalb der *FRT-sites* liegen der 35S-Promotor und das *uidA*-Gen.
- pbTex** Dieser binäre Vektor (14,7 kb) enthält dieselbe Genkassette zur Exzision wie pTex. Zusätzlich enthält der Vektor noch ein *bar*-Gen (BASTA<sup>®</sup>-Resistenz), Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase-Gen zwischen NOS-Promotor und 35S-Terminator.
- pTSin1** Modifizierter Vektor (5,6 kb) mit dem Integrationskonstrukt 1 mit 35S-Promotor, *nptII*-Gen, 35S-Terminator, HSP, FLP-Rekombinase, welche durch ein StLS1-Intron unterbrochen wird und dem OCS-Terminator. Die *FRT-sites* liegen auch hier an denselben Stellen wie bei dem Vektor pTex beschrieben.
- pTSin2** Trägt das Integrationskonstrukt 2 bestehend aus dem von *FRT-sites* flankierten *bar*-Gen und OCS-Terminator (2,7 kb).
- pbTSin1** Der zu pTSin1 entsprechende binäre Integrationsvektor (11,4 kb).

- pbTSin2            Zusätzlich zu der bereits bei pTSin2 beschriebenen Genkassette, trägt dieser entsprechende binäre Integrationsvektor (10,3 kb) das *hpt*-Gen (Hygromycin-Resistenz) zwischen 35S-Promotor und 35S-Terminator.
- pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>    Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Invitrogen (Karlsruhe, D)
- pMON30049        Dieser Vektor enthält das *gfp*-Gen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und den NOS-Terminator und dient zur Kontrolle der biologischen Transformation für die transienten Expressionsstudien.

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide sind von den Firmen VBC-Biotech Services GmbH (Wien, Österreich) und MWG Biotech AG (Ebersberg, D) synthetisiert worden.

#### a) Oligonukleotide zur Promotorisolierung aus Pflanzen-DNA (s. 2.2.1.3.2)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
Schenk/hsp82BFor	CCGTCGCCTTGCCAATTGCCA	72
Schenk/hsp82Rev	ACGTCTCCGTCTCCGAGGCCA	69
Schenk/WCS120For	TTTTTGGCCGGATCCGTGGCG	72
Schenk/WCS120Rev	GTGTAAAGCATATGCAGCGCG	62
TS1/HSP343-361f	CCTCTCGGAAGTCGGAACA	59
TS2/HSP1717-1740r	TGGAGTAGAACGTGTTGATGATGA	60
TS3/WCS26-41f	GTGGCGGGGGACGACA	63
TS4/WCS861-884r	TGTGAAGCAGGTGGTTGTGTAAAG	62
TS5/WCS8-26f	GGGTTTTTGGCCGGATCCG	67
TS6/WCS861-884r	TTGGTAGTGTGAAGCAGGTGGTTG	64
TS7/HSP369-390f	CATCTTGTGCCCTCTTTTCTGG	62
TS8/HSP1660-1680r	GGAGTAGAACGTGTTGATGATGAG	58

#### b) Oligonukleotide zur Einfügung von Schnittstellen (für isolierte Promotoren, s. 2.2.1.3.1)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
TS15/wcsBamHI	GCCGGATCCGTGGCGGGGGACGACA	63
TS16/wcsSbfI	ATTCCTGCAGGGAAGCAGGTGGTTGTGTAAAGC	60
TS22/hspBamHI f	CAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGATCCTA	63
TS23/hspSbf rev	TCTCCGTCTCCGAGGCCATCCTGCAGGAA	63

#### c) Oligonukleotide zur Kontrollsequenzierung der isolierten Promotoren (s. 2.2.1.3.1)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
TS17/HSP1r	CAAAGAACACGGCCTAGGTT	57
TS18/HSP2r	TAAATCGTTATTGTAATACTGCCACTG	60
TS19/HSP3f	TGCAAAGATGCTATTCGAATGACAG	63
TS20/wcs1r	GTATTGTTTGCTTAAGAGGATG	60
TS21/wcs2f	CTTCTAGTTACTCTCATAGTCTCATTGTCTGTTA	60

d) Oligonukleotide zur DIG-Sondenmarkierung (s. 2.2.1.3.4)

Name	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub> [°C]	Sonden größe
ON/npt1	ATGGATTGCACGCAGGTTCTC	62	
ON/npt2	AAGGCGATAGAAGGCGATGCG	65	780 bp
TS/npt1	GAGGCTATTCGGCTATGACTG	64	
TS/npt2	ATCGGGAGCGGGCGATACCGTA	68	750 bp
TS/GUS1	CAGGAAGTGATGGAGCATCAG	64	
TS/GUS2	TCGTGCACCATCAGCACGTTA	64	640 bp
ON/GUS1	TATACGCCATTTGAAGCCG	59	
ON/GUS2	AAGCCAGTAAAGTAGAACGGT	54	580 bp
ON/bar1	AAAGCCTGAACTCACCGCGA	63	
ON/bar2	TCGGTTTCCACTATCGGCGA	64	990 bp
TS31/flp-f	TATGTGCTGCTGAACTAACCTATTT	57	
TS32/flp-r	CGCTTGTCTTTGTCTCTGTCACTA	59	700 bp

e) Oligonukleotide zur Kontrolle des Transgenzustandes (s. 2.2.1.3.2)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
TS24/35S-f	AGATCAACATGGTGGAGCA	55
TS26/35S-r	CTCCAAATGAAATGAACTTCC	54
TS27/GUS-r	TCCAGACTGAATGCCAC	60
TS28/OCS-r	CTCGCATATCTCATTAAAGCAGG	62
TS29/35f	GAAACCTCCTCGGATTCCAT	65
TS30/GUSr	TTTTTGATTTACGGGTTGG	65
TS31/flp-f	TATGTGCTGCTGAACTAACCTATTT	57
TS32/flp-r	CGCTTGTCTTTGTCTCTGTCACTA	59
487/35S	GATGTGATATCTCCACTGACG	61
488/bar	GTACGGAAGTTGACCGTGCTT	62

f) Oligonukleotide für die Multiplex-PCR Analyse (s. 2.2.1.3.3)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
17/npt	AAGGCGATAGAAGGCGATGCG	66
329/35S	TCGGGAAACCTCCTCGGATT	63
459/barR	TGAAGTCCAGCTGCCAGAAAC	61
155/E10-8	GATCATGCTTTAGGTGATGAC	60
156/E10-8	TGAAGCATAACGACAGAAGA	60
208/W2-3	AGCACCTCAATTACCGTCCTA	57
211/W2-3	AGCGTCTAGATTATCACACCA	53

g) Oligonukleotide für RT-PCR Analysen der FLP-mRNA (s. 2.2.2.2)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
AatF	ctctGACGTCTAAGCATGCCACAA	58
F1R	CTGCTAACGCTTGTCTTTGTC	56
18S-FP	TTCAAAGATTACCCGGGCCTGTC	65
18S-RP	GCAATAACAGGTCTGTGATGC	64
5. 18S-FP	AAGTTTCAGCCTTGCGACCA	61
5. 18S-RP	TAGGCGCGCAAATTACCCAAT	63

h) Oligonukleotide für *Inverse* PCR (IPCR) Analysen (s. 2.2.1.3.6)

Name	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub> [°C]
InvP1/3 (35S-R)	ATCCGAGGAGGTTTCCCG	60
InvP1 (ocsR)	TAGCAGTAACGGGTGATATATTCATTAGAATG	62
InvP2 (barF)	GTTTCTGGCAGCTGGACTTCAG	61
InvP2 (barR)	GAAGTTGACCGTGCTTGTCTCG	62
InvP3 (T35sF)	AATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTC	61
InvP4 (flpR)	GCCCAAATCTCACATTGG	59
InvP4 (flpF)	GGTTTCGGTTCATTCTAATGA	55

### 2.1.8 Größenstandards und Sonden

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen werden der Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker und GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Deutschland) vorwiegend eingesetzt. Teils sind auch FastRuler™ DNA Ladder, High und Middle Range der gleichen Firma zum Einsatz gekommen.

In Southern Blots wird als Marker der DIG VII und DIG II Marker von Roche (Mannheim, D) eingesetzt.

Es werden mit Digoxigenin (DIG-[11]-dUTP)) markierte Sonden GUS1/2, *nptII*1/2 und *bar*1/2 (Primer s. 2.1.7) durch PCR (s. 2.2.1.3) hergestellt und als Nachweis der Genkonstrukte im Pflanzengenom verwendet (2.2.1.3.4).

### 2.1.9 Software und Datenbanken

Sequenzanalysen werden mit der Software DNASTAR Lasergene (DNASTAR Inc., USA, Vers. 4.05) ausgewertet. Zur Sequenzansicht wird das Programm Chromas (Technelysium Pty. Ltd., Queensland, Australia, Vers. 1.62) benutzt. Die Kartierung von Vektoren erfolgt mit CLONE MANAGER (Vers. 4.1).

Sequenzanalysen des Pappelgenoms erfolgen mit BLASTn-Datenbankrecherchen auf „<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>“. Die Kartierung erfolgt mit *mapview* der NCBI-Homepage.

## 2.2 Methoden

Grundsätzlich werden alle molekularbiologischen Standardmethoden wie in Sambrook *et al.* (1989) angegeben durchgeführt. Die Herstellung aller Lösungen und Medien erfolgte mit Aqua bidest. (Milli-Q Water System, Millipore, USA) und werden bei Bedarf nach Standard (20 min., 120°C,  $2 \times 10^5$  Pa) autoklaviert oder sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, Dassel, D). Kits und Enzyme werden soweit hier nicht anders angegeben nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.1 Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA

#### 2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) wird Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schock gefroren und in der Schwingmühle Retsch MM 2000 (Retsch, Haan, D.) bei 80% Intensität für drei Minuten aufgeschlossen. Aus dem zerstoßenen Material wird die gDNA nach Pallotta *et al.* (2000) isoliert. Das erhaltene gDNA-Pellet wird meistens in 100 µl R40 aufgenommen und rollend über Nacht bei 4°C gelöst.

Für die Isolierung von Zitterpappel-DNA wird Blatt- und Kallusgewebe ebenso in flüssigem Stickstoff schock gefroren und in einer Schwingmühle (Retsch, Haan, D.) bei 80% Intensität drei Minuten zerkleinert. Daraus wird dann die gDNA nach dem sogenannten CTAB-Protokoll (Doyle und Doyle, 1987) extrahiert.

In beiden Fällen wird die DNA-Konzentration anschließend mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, D) ermittelt.

#### 2.2.1.2 Restriktion von DNA

Für Southern Blot Analysen werden 25 µg genomische Weizen-DNA mit 40U Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 40 µl über Nacht inkubiert. Restriktionspuffer und Temperatur werden laut Herstellerangaben verwendet. Bei Zitterpappelproben werden 20 µg DNA mit 20U Restriktionsenzym inkubiert. Plasmide werden nach den Angaben der Hersteller der Endonuklease restringiert.

### **2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR-Ansätze werden in einem 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß nach Herstellerangaben (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) angesetzt und durchgeführt. Die PCR werden vorwiegend im Thermocycler (Mastercycler<sup>®</sup> ep, Eppendorf, Hamburg, D) durchgeführt.

#### ***2.2.1.3.1 Analytische PCR zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen***

Es werden 0,01 - 1 ng Plasmid-DNA oder alternativ die zu untersuchenden Klone direkt mit einem Zahnstocher in den PCR-Ansatz übertragen. Die Amplifikation erfolgt in 20 oder 50 µl Ansätzen mit je 0,4 µM Primer, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTP's, PCR-Puffer mit Kaliumchlorid und 1U *Taq*-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D).

Der PCR-Lauf erfolgt bei 94°C 2 min// 94°C 30sec/ 5°C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids 30sec, 72°C 90sec, 25 Zyklen//72°C 5 min.

#### ***2.2.1.3.2 PCR mit genomischer DNA***

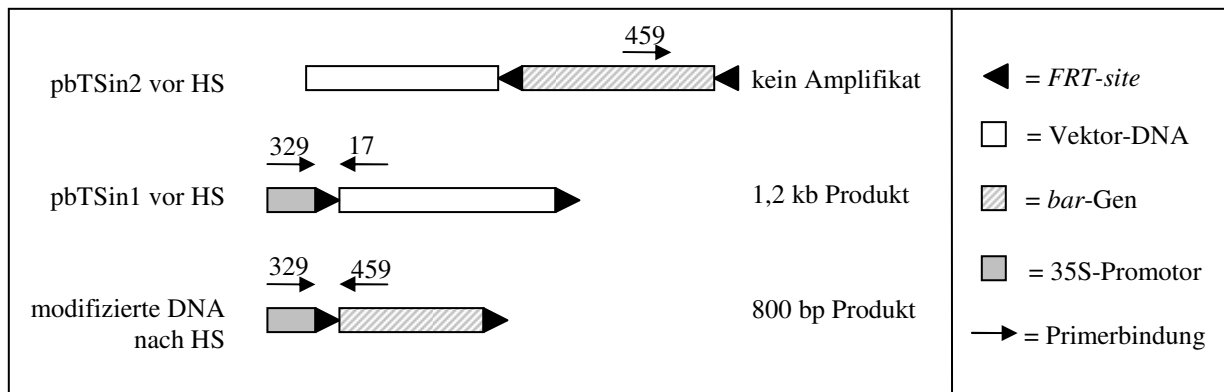
Hierfür werden 150-200 ng gDNA in einen 50 µl PCR-Ansatz pipettiert. Der PCR-Lauf erfolgt bei Zitterpappel-DNA 95°C 2 min// 94°C 1 min/ 5°C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids 1 min/ 72°C 2 min, 40 Zyklen//72°C 10 min.

Der PCR-Lauf mit Weizen-DNA setzt sich wie folgt zusammen:

97°C 5 min//95°C 45 sec/ 5°C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids 2 min//72°C 2,5 min, 35 Zyklen/ 72°C 10 min.

#### ***2.2.1.3.3 Multiplex-PCR zum Transgennachweis***

In der Multiplex-PCR werden zur Analyse der hitzegeschockten doppeltransgenen Zitterpappellinien auf erfolgreiche Integration transgenspezifische Primerpaare (329/17, 329/459) und zusätzlich genomische Primer (s. 2.1.7f) eingesetzt, welche ein 380 bp (208/211) bzw. 250 pb (155/156) langes Amplifikat ergeben und zur Kontrolle der PCR-Reaktion dienen. Die transgenspezifischen Primerpaare werden so gewählt, dass die PCR-Amplifikate Rückschlüsse auf das neu modifizierte Genkonstrukt der hitzegeschockten auf Basta<sup>®</sup>-haltigem Selektionsmedium regenerierenden Kalli zulassen. Das Primerpaar 329/17 bindet im 35S-Promotor und im Kanamycin-Resistenzgen, welches im ursprünglichen Zustand vor der Hitzebehandlung ein 1,2 kb langes Produkt, nach dem Hitzeschock jedoch kein Amplifikat ergeben darf. Die Primer 329/459 ergeben erst nach erfolgreicher Integration des *bar*-Gens hinter den 35S-Promotor ein Amplifikationsprodukt von 800 bp (s. Abbildung 6). Der PCR-Lauf entspricht dem Lauf der PCR mit gDNA bei Zitterpappel.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Primerbindung auf der ursprünglichen T-DNA und der durch den Hitzeschock (HS) modifizierten DNA. Erst nach dem HS entsteht mit den Primern 329/459 ein Amplifikat der Länge 800 bp. Das Primerpaar 329/17 ergibt nur vor der Rekombination ein 1,2 kb langes PCR-Produkt.

#### 2.2.1.3.4 Herstellung von DNA-Sonden mit Digoxigenin

Die unterschiedlichen Digoxigenin markierten DNA-Sonden werden mit den unter 2.1.7 angegebenen Primern in einer nach Herstellerangaben (Roche, Mannheim, D) modifizierten PCR hergestellt. Als Template dient 1 ng des entsprechenden zur Transformation benutzten Vektors, gegen den die Sonde später hybridisieren soll. Der PCR-Lauf wird folgendermaßen durchgeführt: 95°C 2 min// 95°C 30 sec/ 5°C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids 30 sec/72°C 2 min, 30 Zyklen/ 72°C 10 min.

##### GUS-Sonde für Southern Blot Analysen

Primerpaar: TS/GUS1 + TS/GUS2 (2.1.7)

Als DNA-Matrize wurde pTex (2.1.6) eingesetzt.

Größe des amplifizierten Framgents: 640 bp

##### nptII-Sonde für Southern Blot Analysen

Primerpaar: TS/npt1 + TS/npt2 (2.1.7)

Als DNA-Matrize wurde pTex (2.1.6) eingesetzt.

Größe des amplifizierten Framgents: 750 bp

##### Bar-Sonde für Southern Blot Analysen

Primerpaar: ON/bar1 + ON/bar2 (2.1.7)

Als DNA-Matrize wurde pbTSin2 (2.1.6) eingesetzt.

Größe des amplifizierten Framgents: 990 bp



### 2.2.1.3.5 Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Die radioaktiv-markierten DNA-Sonden wurden mit dem HexaLabel™ DNA Labeling Kit der Firma Fermentas GmbH (St. Leon Rot, D) entsprechend der Herstellerangabe random primed mit [<sup>32</sup>P]-dCTP und/oder [<sup>32</sup>P]-dATP markiert. Als Matrize für die FLP-Sonde wurde ein PCR-Fragment (Primerpaar: TS31/flp-f und TS32/flp-r) bzw. ein Restriktionsfragment des FLP-Gens nach Eluierung des benötigten DNA-Fragments aus einem Agarosegel verwendet.

### 2.2.1.3.6 Inverse PCR zur Genomanalyse bei Zitterpappel

Die Methode der *Inverse PCR* (IPCR) (Ochman *et al.*, 1988) wird hier genutzt um den unbekanntem genomischen Insertionsort von bekannten DNA-Sequenzen zu identifizieren.

Hierfür wird 10 µg gDNA von Zitterpappel über Nacht so restringiert, dass die Restriktionsendonuklease (*HindIII* bzw. *XhoI*) innerhalb der bekannten DNA-Sequenz schneidet und der zweite Schnitt zufällig im Genom erfolgt. Dann wird der Restriktionsansatz mit 5 M Lithiumchlorid gefällt und anschließend mit der T4 DNA Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben an den zuvor hydrolysierten Restriktionsschnittstellen religiert. Nach einer erneuten Lithiumchloridfällung erfolgt eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Diese so behandelte DNA dient als Template für die IPCR.

Die verwendeten Primerpaare InvP1 und InvP2 (s. 2.1.7h) binden auf der Sequenz des Vektors pbTSin2. InvP1(35S-R) bindet am 3'-Ende des 35S-Promotors und InvP1(ocsR) bindet am 3'-Ende des OCS-Terminators. Der Primer InvP2(barF) bindet am 5'-Ende und InvP2(barR) am 3'-Ende des *bar*-Gens. Durch den Ringschluß der restringierten DNA ist so eine Sequenzierung sowohl auf der 3'-Seite als auch auf der 5'-Seite der bekannten Vektorsequenz in das Genom möglich.

Die Primerpaare InvP3 und InvP4 (s. 2.1.7h) binden auf der pbTSin1 Vektorsequenz. InvP3(35S-R) entspricht dem InvP1(35S-R) Primer und InvP3(T35sF) bindet am 5'-Ende des T35S-Terminators. InvP4(flplR) bindet am 3'-Ende und InvP4(flplF) bindet am 5'-Ende des FLP-Gens.

Der PCR-Lauf setzt sich folgendermaßen zusammen: 95°C 2 min// 94°C 1 min/ 5°C unter der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonukleotids 1 min/ 72°C 2 min, 40 Zyklen//72°C 10 min. Die Amplifikate der IPCR werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel eluiert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen werden sowohl mit dem Zitterpappelgenom als auch mit der Vektorsequenz auf Homologien überprüft (s. 2.1.9).

### 2.2.1.4 Southern Blot

Für Southern Blot Analysen wird 15-25 µg genomische DNA restringiert und in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird das Gel je 30 Minuten in Denaturierungspuffer und danach in Neutralisierungspuffer gewaschen. In 20x SSC als Transferflüssigkeit wird die DNA durch Kapillartransfer (Southern, 1975) auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>®</sup>NX, Amersham, Freiburg, D) übertragen. Auf dieser wird die DNA mit einem UV-Crosslinker (Stratalinker Stratagene, Heidelberg, D) mit 1200 µJ/cm<sup>2</sup> fixiert. Der anschließende Nachweis der spezifischen DNA-Sequenz erfolgt mit der jeweiligen DIG-markierten DNA Sonde (s. 2.2.1.3.4) in einer Konzentration von 20-25 ng/ml Hybridisierungslösung. Bei Weizen wird als Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb von Roche (Mannheim, D), bei Zitterpappel ein Formamid-haltiger Hybridisierungspuffer (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Die Detektion der DIG-markierten DNA findet chemilumineszent mit anti-DIG Antikörpern mit Alkalischer Phosphatase und CSPD (beides Roche, Mannheim, D) nach Herstellerangaben statt. Die Membran wird anschließend auf Hyperfilme<sup>™</sup> von Amersham (Freiburg, D) bzw. Roche (Mannheim, D) exponiert. Die Southern Blot Analysen bei Zitterpappel-DNA erfolgen mit der in Fladung und Ahuja (1995) angegebenen Technik.

Für die Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden wurde der Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) verwendet. Die Hybridisierung mit der [<sup>32</sup>P]-dCTP- bzw. [<sup>32</sup>P]-dATP-markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Filter wurden 10-15 min bei 65°C in folgenden Lösungen gewaschen: einmal mit 2x SSC; 0,1 % SDS und einmal mit 0,5x SSC; 0,1 % SDS. Eine erste Exposition erfolgte über Nacht auf *Imaging Plates* der Firma Fujifilm (Kanawaka, Japan). Die anschließende Exposition auf Röntgenfilme dauerte 2 bis 4 Wochen.

## 2.2.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA

### 2.2.2.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blättern von Weizen erfolgt mit peqGOLD TriFast<sup>™</sup> (peqlab, Erlangen, D). Das Blattmaterial von jungen Blättern (4-5fache Eppilänge) wird in 2 ml Eppendorfgefäße mit zwei Stahlkugeln in flüssigem Stickstoff schock gefroren. In der Schwingmühle (Retsch, Haan, D) wird das Blattmaterial drei Minuten bei 80% zerkleinert und daraus anschließend die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Die isolierte RNA wurde in denaturierenden MOPS-Formaldehydgelen (Sambrook *et al.*, 1989) auf deren Qualität und Konzentration überprüft.

### 2.2.2.2 RT-PCR zum Nachweis von mRNA der FLP-Rekombinase

Die Primer AatF und F1R (s. 2.1.7g) binden in der kodierenden Sequenz des FLP-Gens und amplifizieren ein 700 bp langes Fragment. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen werden Primer gegen die stark konservierte 18S rRNA eingesetzt, welche freundlicherweise von N. Schlattermund (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt worden sind. Die isolierte RNA (s. 2.2.2) wird nach Herstellerangaben DNaseI behandelt und mit M-MuLV Reverse Transkriptase die cDNA-Synthese in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D). Für die anschließende PCR (Gesamtvolumen 50 µl) werden 4 µl aus der cDNA-Synthese als Template eingesetzt. Der PCR-Lauf entspricht dem einer analytischen PCR (s. 2.2.1.3.1).

### 2.2.2.3 Northern Blot

Für Northern Blot Analysen werden zunächst 15 µg Gesamt-RNA in einem MOPS-Formaldehydgel aufgetrennt. Danach erfolgt sofort mittels 20x SSC als Transferpuffer der RNA-Kapillartransfer auf eine Hybond<sup>®</sup>N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham, Freiburg, D) über Nacht. Im UV-Crosslinker (Stratalinker Stratagene, Heidelberg, D) wird die RNA bei 1200 µJ/cm<sup>2</sup> auf der Membran fixiert. Für die Prä- bzw. Hybridisierung wurde Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) verwendet. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Filter wurden 10-15 min bei 65°C in folgenden Lösungen gewaschen: zweimal mit 1x SSC; 0,1 % SDS und einmal mit 0,5x SSC; 0,1 % SDS. Die Expositionen erfolgten zunächst 20 h auf *Imaging Plates* und anschließend 1 bis 4 Wochen auf Röntgenfilmen.

## 2.2.3 Transformation von Pflanzenmaterial

### 2.2.3.1 Biolistische Transformation von unreifen Weizenembryonen

Als Ausgangsmaterial für die biolistische Transformation dienen unreife Weizenembryonen, die zwei Wochen nach deren Blüte aus oberflächensterilisierten Weizenkaryopsen isoliert werden. Die Herstellung des DNA-Fällungsansatzes für die biolistische Transformation und der Beschuss selbst erfolgt mit denselben Parametern wie in Becker *et al.* (1994) angegeben mit der Particle Gun von Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Als Selektionsmarker wird das im Vektor pTex enthaltene *nptII*-Gen (s. 2.1.6) übertragen, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermittelt. Die Selektion von transgenem Gewebe erfolgt zum einen auf kallusinduzierenden Selektionsmedien (s. 2.1.2) und zum anderen werden Pflanzen,

welche erfolgreich Sprosse und Wurzeln gebildet haben, nach dem Transferieren in Erde durch einen Sprühtest mit einer 3%-igen Kanamycinlösung (beinhaltet 0,1% Tween 20) erneut einer Selektion unterzogen.

Für transiente Expressionsstudien, wie z. B. bei den Promotorstudien (s. 3.1) angewandt, werden ebenfalls unreife Weizenembryonen zwei Wochen nach deren Blüte aus oberflächensterilisierten Weizenkaryopsen isoliert und auf gleiche Art und Weise, wie für die stabile Transformation oben beschrieben, beschossen. Jedes Promotor-Gusi-AM Konstrukt wurde in drei unabhängigen Transformationsansätzen mit je 30 Embryonen auf zwei Petrischalen verteilt für jede gewählte Parametereigenschaft (s. 3.1.2) getestet. Jedoch wurden die beschossenen unreifen Weizenembryonen nicht zur Kallusproliferation weiterkultiviert, sondern nach einer Regenerationsphase von einem Tag nach Beschuss, auf Induktionsmedium verbleibend den jeweiligen Vorhaben unterzogen (s. 3.1).

### **2.2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von Zitterpappel**

Die Transformation von Zitterpappelkulturen erfolgt mit Hilfe der Blattscheiben-Technik (*leaf disk inoculation*, Curtis *et al.*, 1995) und des von Agrobakterien-vermittelnden DNA Transfers (Fraley *et al.*, 1983; Fladung *et al.*, 1997). Die Zitterpappelkulturen werden mit folgenden Vektoren (s. 2.1.6) transformiert:

- a) zur Untersuchung der Exzision (s. 3.4) mit dem Vektor pbTex und
- b) zur Untersuchung der Integration (s. 3.5) mit den Vektoren pbTSin1 und pbTSin2.

Zwei Tagen nach der Beimpfung werden sie fünfmal in cefotaximhaltigem Wasser (500 mg/L) gewaschen. Nach einem Waschschrift in sterilem Wasser werden sie auf Selektionsmedium (601, s. 2.1.2) überführt. Die Selektionsmedien enthalten permanent 500 mg/L des Zytostatikas Cefotaxim zur Wachstumshemmung verbleibender Agrobakterien. Zusätzlich dazu werden jedoch auch im Fall a (Exzision) 50 mg/L Kanamycinsulfat (601KC), im Fall b (Integration) 50 mg/L Kanamycinsulfat und 10 mg/L Hygromycin (601KHC) zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen zugesetzt.

Größere regenerierende Kalli werden isoliert und unter ständigem Selektionsdruck alle vier bis fünf Wochen auf neues Medium überführt. Um einzelne Zitterpappelbäumchen zu erhalten, werden einzelne Sprosse auf Bewurzelungsmedium (460, s. 2.1.2) in Magentadosen überführt, welche dieselben Kombinationen an Antibiotika wie zuvor die 601er Medien enthalten.

### 2.2.4 Aktivierung des Gmhsp17.5-E Promotors

Für die Aktivierung des Hitzeschockpromotors Gmhsp17.5-E aus der Sojabohne (*Glycine max.*) werden die transgenen Weizenlinien 6 Stunden bei 39°C im Licht hitzestressiert. Nach einem halben Tag unter Normalbedingungen werden junge Blätter abgeschnitten und einer GUS-Färbung (s.2.2.5) unterzogen. Außerdem wird aus jungen Blättern entweder genomische DNA (gDNA) isoliert (s. 2.2.1.1) oder Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C für weitere Untersuchungen gelagert.

Der Hitzeschock bei den transgenen Zitterpappellinien erfolgt in Magentadosen in einem Klimaschrank für 3 Stunden bei 42°C. Erst nach einer Erholungsphase von einer Nacht unter Normalbedingungen (25°C) werden im Falle der Exzision (s. 2.2.3.2a) die Pflanzen vollständig geerntet, um die hitzebehandelten Blätter einer GUS-Färbung zu unterziehen. Außerdem wird ebenfalls direkt gDNA isoliert und das restliche hitzebehandelte Pflanzenmaterial schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Im Falle der Integrationsstudien (s. 2.2.3.2b) werden die hitzeshockten doppeltransgenen Pflanzen mit dem Skalpell in kleine Stücke unter 1 mm zerkleinert und auf Hygromycin- und Basta<sup>®</sup>-haltiges (2 mg/L) Selektionsmedium überführt (601HBC). Diese Kulturen werden bis zu vier Monate unter ständiger Beobachtung unter Langtag-Bedingungen in der Klimakammer kultiviert.

### 2.2.5 Histochemische GUS-Färbung

Die Expression des GUS-Gens und die dadurch verbundene Produktion der  $\beta$ -Glukuronidase lassen sich mittels eines histochemischen GUS-Tests nachweisen. Die GUS-Färbung erfolgt leicht abgeändert nach (Jefferson *et al.*, 1987).

Zunächst werden einen Tag nach erfolgtem Hitzeschock (s. 2.2.4) die zu untersuchenden Blätter geerntet und mit einem Färbepuffer [100 mM Natriumhydrophosphat, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, pH 7,0], der in einer Konzentration von 1,5 mM das Substrat X-Gluc (5-Brom-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glukuronsäure) enthält, überschichtet. Die Proben werden 10 Minuten lang Vakuum behandelt, im Falle der Zitterpappel im Exzikator, im Falle des Weizens bei 27 inch Hg in der Particle Gun (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgt die Extraktion des Chlorophylls mit GUS-Entfärbepuffer (3:1 96% Ethanol:Eisessig) bei 50°C. Dieser Schritt wird zwei bis dreimal wiederholt, bis das Blattmaterial weißlich erscheint und das Chlorophyll vollständig entfernt ist.

Auf diese Weise kann zum einen überprüft werden, ob möglicherweise eine Exzision in transgenen Pflanzen mit dem Vektor p(b)Tex (s. 2.1.6) nach dem Hitzeschock stattgefunden hat. Zum anderen lassen sich wie in den transienten Promotorstudien (s. 3.1) angestrebt, die Effizienz verschiedener Induktionsparameter ermitteln.

Vor der GUS-Färbung der biolistisch transformierten unreifen Weizenembryonen jedoch werden zunächst die GFP-Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Danach werden die Embryonen auf dem Induktionsmedium in Petrischalen mit X-Gluc Färbepuffer leicht überschichtet und bis zu 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Zuletzt werden die GUS-Färbesignale unter dem Binokular ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems in Weizen und Zitterpappel zur Exzision von Markergenen und zur zielgerichteten Integration von Transgenen.

Für die gezielte Aktivierung des FLP-Rekombinationssystems wurden zunächst geeignete induzierbare Promotoren ausgesucht und die Induzierbarkeit in den Pflanzen durch transiente Expressionsstudien überprüft. Es erfolgte die stabile Transformation von Weizen und Zitterpappel mit den klonierten Exzisions- (s. Abbildung 11) und Integrationskonstrukten (s. Abbildung 12 und Abbildung 13), welche die Rekombinase unter Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors und die *FRT*-Erkennungsstellen (*FRT-site*) tragen.

Im Falle der Exzisionsstudien sollte durch den Hitzeschock die Rekombinase aktiviert werden, so dass das Fragment zwischen den *FRT*-Erkennungsstellen herausgeschnitten wird. Damit gelangt das promotorlose GUS-Gen unter die Kontrolle des 35S-Promotors, dessen Aktivität mittels eines histochemischen GUS-Assays überprüft werden sollte.

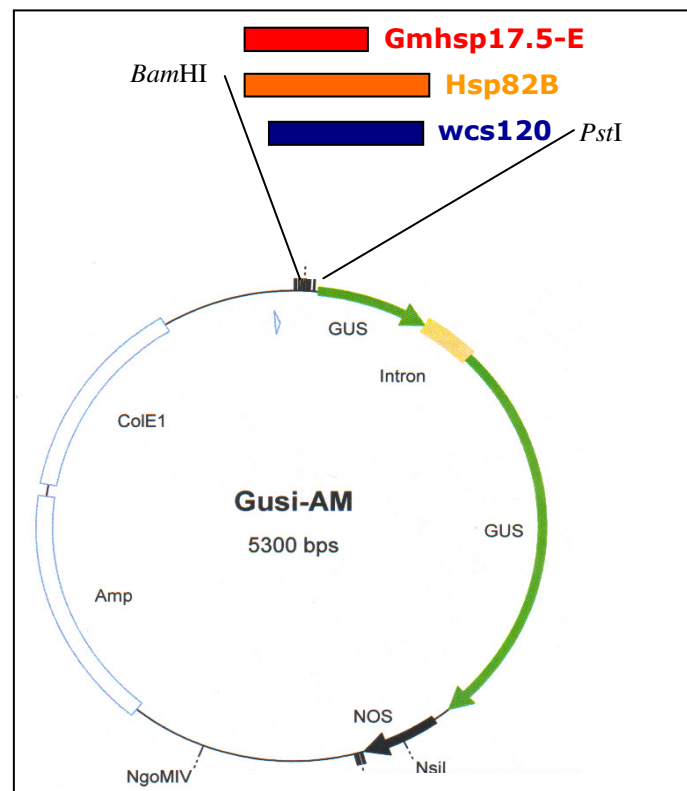
Im Falle der zielgerichteten Integrationsstudien sollte nicht nur die Selbstexzision der Rekombinase erfolgen, sondern auch die Integration eines promotorlosen *bar*-Gens, welches auf einem zweiten, unabhängig transformierten Genkonstrukt liegt, hinter den 35S-Promotor. Erfolgreich rekombinierte Pflanzen weisen eine neue Basta<sup>®</sup>-Resistenz auf. In beiden Fällen sollte durch molekularbiologische Analysen der hitzebehandelten Pflanzen die Rekombination nachgewiesen werden.

#### 3.1 Expression der Promotor-Gusi-AM Konstrukte

##### 3.1.1 Promotorisolierung und -Klonierung

Um die FLP-Rekombinase extern kontrollieren zu können, werden geeignete induzierbare Promotoren benötigt. Studien von Dr. Matthias Fladung (VTI, Institut für Forstgenetik, Großhansdorf) hatten bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass der Promotor Gmhsp17.5-E (*Glycine max*) in Zitterpappel (Dikotyledonen) durch Hitzestress induzierbar ist. Da der Promotor Gmhsp17.5-E (NCBI: M28070.1) in Weizen (Monokotyledonen) bisher nicht untersucht wurde, galt es parallel für Weizen (*Triticum aestivum* L.) nach zusätzlichen induzierbaren Promotoren zu suchen. Im Rahmen von transienten Expressionsstudien mit dem GUS-Markergen sollte deren Induzierbarkeit in unreifen Weizenembryonen untersucht werden. Als mögliche in Frage kommende Promotoren wurden der kalteinduzierbare wcs120-

und der hitzeinduzierbare Hsp82B-Promotor ausgewählt. Da bereits beide Promotorsequenzen publiziert waren (wcs120: AY493570 und Hsp82B: Z11920), wurden entsprechende Primer (s. 2.1.7a) entworfen, um die jeweiligen Promotoren aus genomischer DNA von Weizen und Reis zu amplifizieren. Anschließend wurde die amplifizierte DNA sequenziert, um Mutationen auszuschließen (s. Anhang). Der isolierte Hsp82B Promotor wies zwar drei Punktmutationen auf: T667G, T804C und C905T, die jedoch alle außerhalb publizierter Domänen lagen. Zusätzlich angebrachte Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Pst*I (s. 2.1.7b) dienten der anschließenden Klonierung in den Vektor pGusi-AM. Der Gmhsp17.5-E Promotor (bereitgestellt von Dr. M. Fladung, VTI, Großhansdorf) konnte direkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I aus der Multiple Cloning Site (MCS) seines ursprünglichen Vektors herausgeschnitten und ebenfalls vor das GUS-Gen des promotorlosen Vektors pGusi-AM kloniert werden (s. Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Gusi-AM Vektors mit der MCS zur Integration der Promotoren wcs120, Hsp82B und Gmhsp17.5-E. Nach Isolierung der Promotoren mittels PCR aus dem Genom wurden zusätzlich die Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I eingeführt, um sie in die MCS vor das GUS-Gen zu klonieren. MCS: Multiple Cloning Site, Intron: StLS1, GUS: GUS-Gen

### 3.1.2 Induzierung der Promotor-Gusi-AM Konstrukte

Um die Induzierbarkeit der drei Promotoren zu überprüfen, wurden transiente Expressionsstudien in unreifen Weizenembryonen durchgeführt. Hierfür wurden die Promotor-Gusi-AM-Vektoren (Abbildung 7) jeweils in drei unabhängigen biolistischen

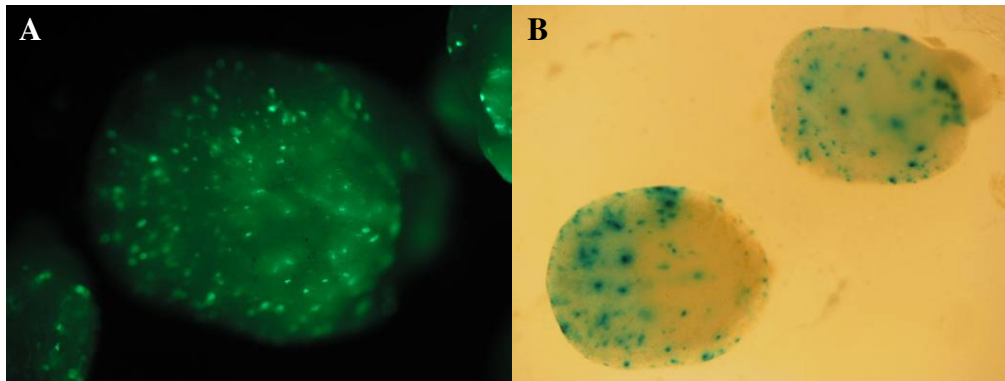


Transformationsansätzen, jeweils mit mindestens 30 Weizenembryonen, auf insgesamt zwei unterschiedlichen Petrischalen verteilt, transformiert und den jeweiligen Versuchsbedingungen unterzogen. Dadurch sollte deren Spezifität zur Induktion durch einen Stressfaktor (Hitze bzw. Kälte) untersucht werden. Da die Varianz zwischen den unabhängigen Transformationsansätzen mit der biolistischen Transformationsmethode sehr hoch ist, wurde als interner Standard ein konstitutiv exprimiertes GFP-Reportergen (pMON30049, s. 2.1.6) in Ko-Transformationen mittransformiert, um die erhaltenen GUS-Daten mit der GFP-Expression zu normalisieren. Dabei wurden beide Konstrukte in gleicher Konzentration (2,5 µg DNA) zusammen in einem Goldpartikelansatz geschossen. Die mit den Promotor-Gusi-AM Konstrukten transformierten Weizenembryonen wurden nach einer Regenerationsphase über Nacht den jeweiligen Promotor aktivierenden Bedingungen in verschiedenen Modifikationen (Zeit, Temperatur) ausgesetzt (s. Tabelle 1). Hiermit sollte die Effizienz der Promotoren bei unterschiedlichen Parametern getestet werden.

**Tabelle 1: Versuchsschema der Ko-transformationen zur transienten Expression der Promotor-Gusi-AM Konstrukten und verwendete Versuchsparameter (Zeit und Temperatur).** Der Fällungsansatz wurde mit 2,5 µg des entsprechenden Plasmids (GUS mit induzierbarem Promotor und pMON30049) angesetzt. Ein Pluszeichen (+) steht für die erfolgreiche Versuchsdurchführung, Versuchsparameter mit Minuszeichen (-) wurden nicht getestet.

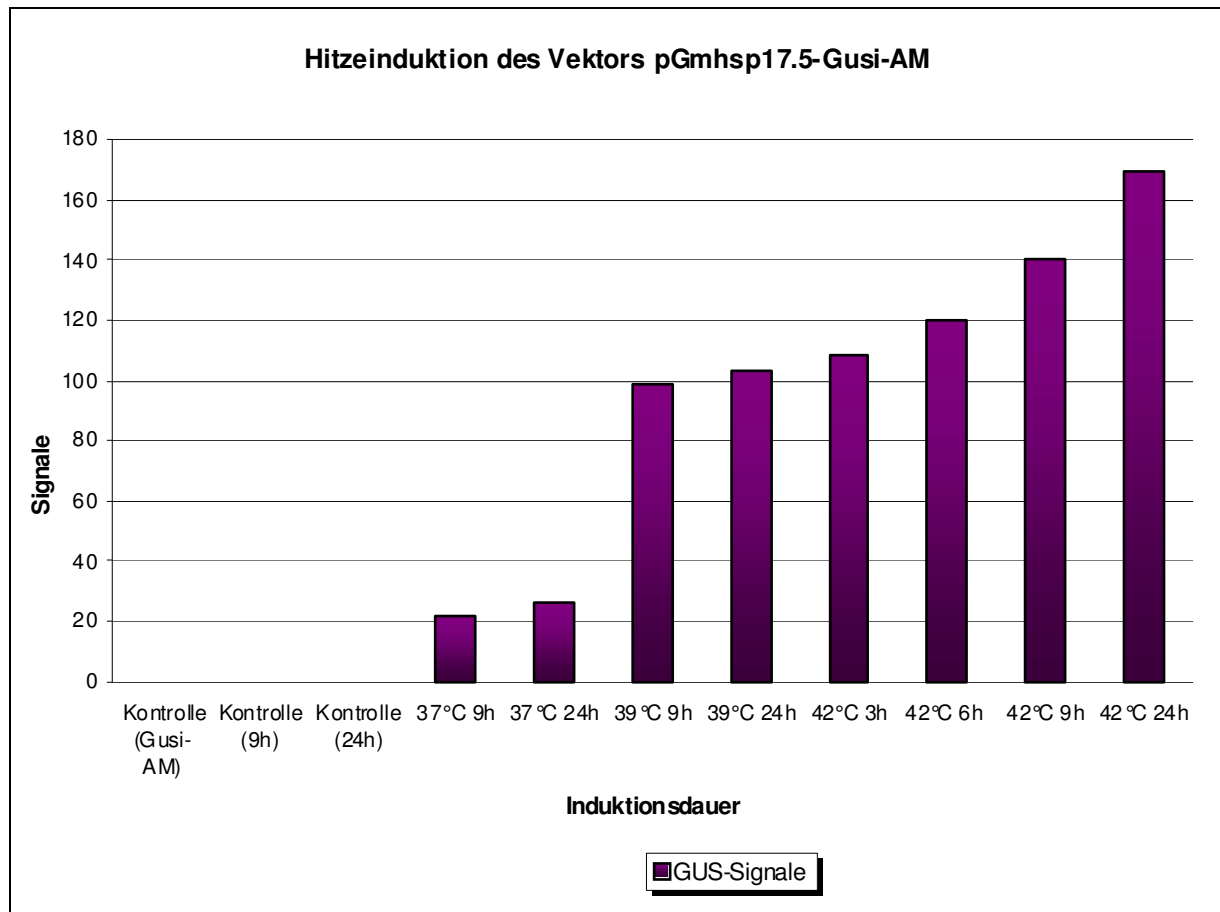
		<b>pGmhsp17.5-E-Gusi-AM</b>	<b>pHsp82B-Gusi-AM</b>	<b>pGusi-AM ohne Promotor</b>	<b>pWcs120-Gusi-AM</b>
Temp.	Zeit	DNA (2,5 : 2,5) Gmhsp : pMON	DNA (2,5 : 2,5) Hsp82B : pMON	DNA (2,5 : 2,5) Gusi-AM : pMON	DNA (2,5 : 2,5) wcs120 : pMON
37°C	3h	-	+	-	-
	6h	-	+	-	-
	9h	+	+	-	-
	24h	+	+	-	-
39°C	3h	-	+	-	-
	6h	-	+	-	-
	9h	+	+	-	-
	24h	+	+	-	-
42°C	3h	+	+	-	-
	6h	+	+	+	-
	9h	+	+	+	-
	24h	+	+	+	-
4°C	3d	-	-	-	+
	6d	-	-	-	+

Eine Übersicht der verschiedenen getesteten Parameter für die Induktion der Promotoren gibt Tabelle 1 wieder. Der Hitzeschock wurde mit verschiedenen Temperaturen (37°C, 39°C, 42°C) und in unterschiedlicher Dauer (3h, 6h, 9h, 24h) durchgeführt. Die Kälteadaptation erfolgte bei 4°C über drei bzw. sechs Tage. Nach dem Temperaturschock wurde eine Erholungsphase über Nacht (26°C, Dunkelheit) gesetzt, nach der die Detektion der GFP- und GUS-Expression erfolgte, die exemplarisch in Abbildung 8 dargestellt ist.



**Abbildung 8:** Mit den pGmhsp17.5-E-Gusi-AM und pMON30049 Konstrukten biolistisch ko-transformierte unreife Weizenembryonen. A: GFP-Signale unter UV-Bestrahlung (395 nm) im Fluoreszenzmikroskop, B: GUS-Signale nach der histochemischen Färbung mit X-Gluc.

Zunächst wurden die GFP-Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und danach die beschossenen unreifen Weizenembryonen einer GUS-Färbung (s. 2.2.5) unterzogen. Die sichtbaren einzelnen Spots in Abbildung 8 stellen einzelne Scutellumzellen dar, die erfolgreich biolistisch transformiert wurden und in denen es zur Transkription der Reportergene gekommen ist. Die detektierbaren GFP- und GUS-Signale der einzelnen Promotor-Gusi-AM Konstrukte wurden quantitativ pro Weizenembryo erfasst und für die anschließende Auswertung gemittelt. Für die Induktionsstudien erfolgten insgesamt drei unabhängige Transformationsansätze mit je 30 Embryonen auf zwei Petrischalen verteilt, um die verschiedenen biolistischen Beschüsse trotz ihrer hohen Varianz besser miteinander vergleichen zu können.



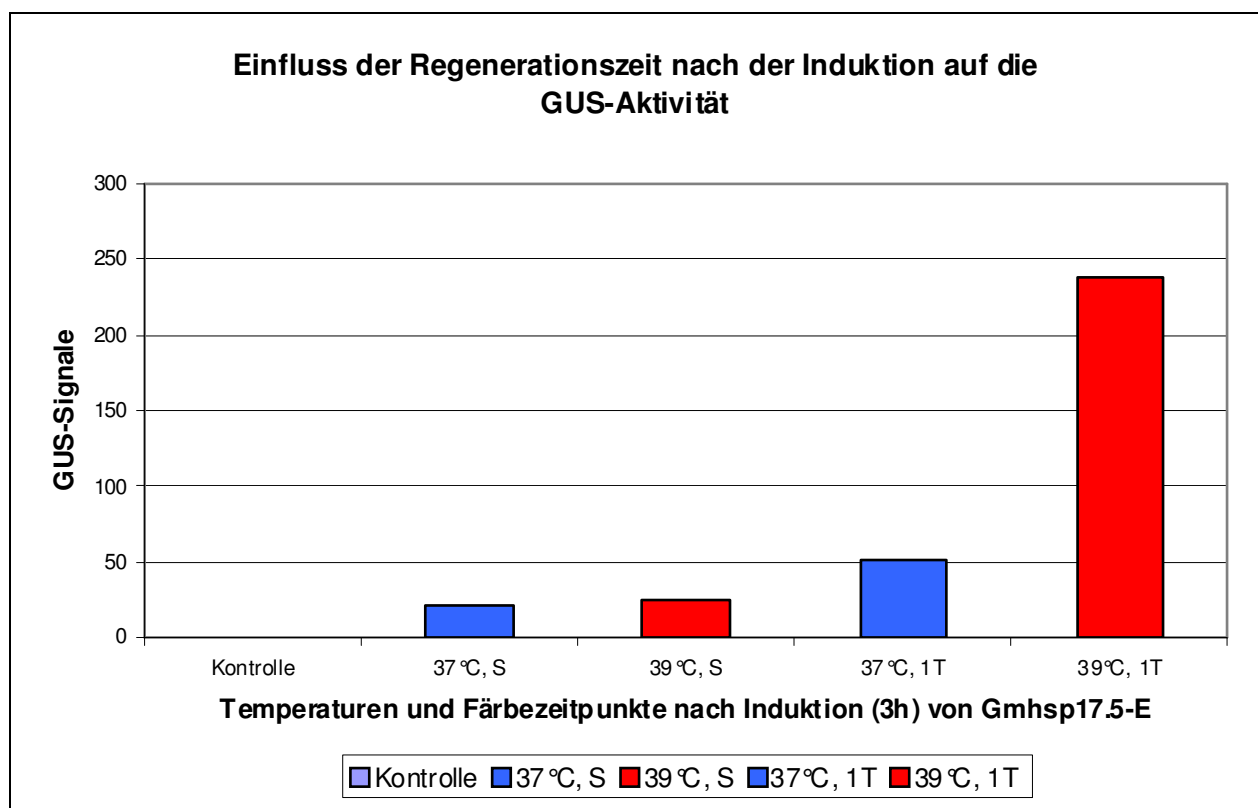
**Abbildung 9:** Graphische Darstellung der normalisierten GUS-Signale resultierend aus der Aktivierung des Gmhs17.5-E Promotors in Abhängigkeit von Temperatur und Dauer des Hitzeschocks. Die einzelnen Hitzebehandlungen der Weizenembryonen, erfolgten in drei unabhängigen Transformationsansätzen jeweils mit mindestens 30 Embryonen auf zwei Petrischalen verteilt. Um die Varianz der biolistischen Beschüsse zu relativieren wurden die gemittelten GUS-Signale pro Embryo mit den gemittelten GFP-Signalen normalisiert.

Die Anzahl der nach Hitzebehandlung detektierten GFP- und GUS-Signale pro Embryo wurden gemittelt und die GUS-Werte anhand der jeweiligen GFP-Signale normalisiert. Diese normalisierten GUS-Signale sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Induktion des Gmhs17.5-E Promotors in unreifen Weizenembryonen bei unterschiedlichen Zeitdauern und Temperaturen führte zu einer zuverlässigen Aktivierung des Promotors und des nachgeschalteten GUS-Reportergens. Durch diese transienten Expressionsstudien wird deutlich, dass der Promotor bei längeren und größeren Hitzeeinwirkungen stärker aktiviert wird. Die stärkste Aktivierung des Gmhs17.5-E Promotors wurde bei einer 24-stündigen Hitzebehandlung bei 42°C detektiert. Bei dieser Hitzebehandlung wurden insgesamt 66 GUS-Signale und 39 GFP-Signale pro Embryo gezählt, dies entspricht einem normalisierten GUS-Wert von 169 (s. Abbildung 9).

Die Hitzeinduktion des Hsp82B Promotors und die Kältebehandlung des wcs120 Promotors führten zu keinerlei GUS-Aktivität. Durch die in allen Fällen detektierten GFP-Signale kann ein Fehler bei der biolistischen Transformation ausgeschlossen werden. Es gilt somit

festzuhalten, dass die Promotoren Hsp82B und wcs120 in transient transformierten Weizenembryonen unter den gesetzten Parametern nicht induzierbar sind. Daher wurde in den weitergehenden Experimenten ausschließlich mit dem Promotor Gmhsp17.5-E gearbeitet.

Neben der Beeinflussung der Temperatur und Dauer der Induktion wurde auch der Einfluss der Regenerationsphase, welche nach der Induktion gesetzt wurde, auf die GUS-Aktivität näher charakterisiert. Dazu wurden in drei unabhängigen Transfromationsansätzen mit je 30 Weizenembryonen auf zwei Petrischalen verteilt unterschiedlich lange Regenerationszeiten nach erfolgter Induktion bis zur GUS-Detektion untersucht (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Graphische Darstellung des Einflusses der Regenerationsphase nach erfolgter Induktion auf die detektierbare GUS-Aktivität.** Es wurde entweder sofort (S, blau) oder ein Tag (1T, rot) nach der Hitzeinduktion von drei Stunden die GUS-Färbung mit X-Gluc (s. 2.2.5) durchgeführt. Dargestellt sind die aus drei unabhängigen Transformationsansätzen mit je 30 Embryonen gemittelten GUS-Signale pro Embryo.

Hierbei zeigte sich, dass die sofortige Färbung nach dem Hitzeschock zu einer deutlich verminderten Anzahl GUS-positiver Zellen (s. Abbildung 10, S) führt, nämlich unter 30 Signale pro Embryo. Obwohl die Bedingungen des Hitzeschocks in Dauer und Temperatur exakt gleich waren (3 Stunden bei 37°C bzw. 39°C), wird nach einer Regenerationsphase von 24 Stunden mehr als 50 Signale (bei 37°C) bzw. bei 39°C mehr als 200 GUS-Signale pro Embryo detektiert (s. Abbildung 10, 1T). Die hier getestete Regenerationsphase ermöglicht

eine deutlich höhere Proteinmenge und damit die Detektierbarkeit GUS-exprimierender Zellen.

Durch die Promotoranalysen konnte gezeigt werden, dass der Gmhsp17.5-E Promotor unter den gegebenen Bedingungen auch in Weizen aktivierbar ist. Im Rahmen der Untersuchungen wurde keine durch andere Faktoren induzierbare Aktivität beobachtet. Dies war die Voraussetzung für die Klonierung der Exzisions- und Integrationskonstrukte.

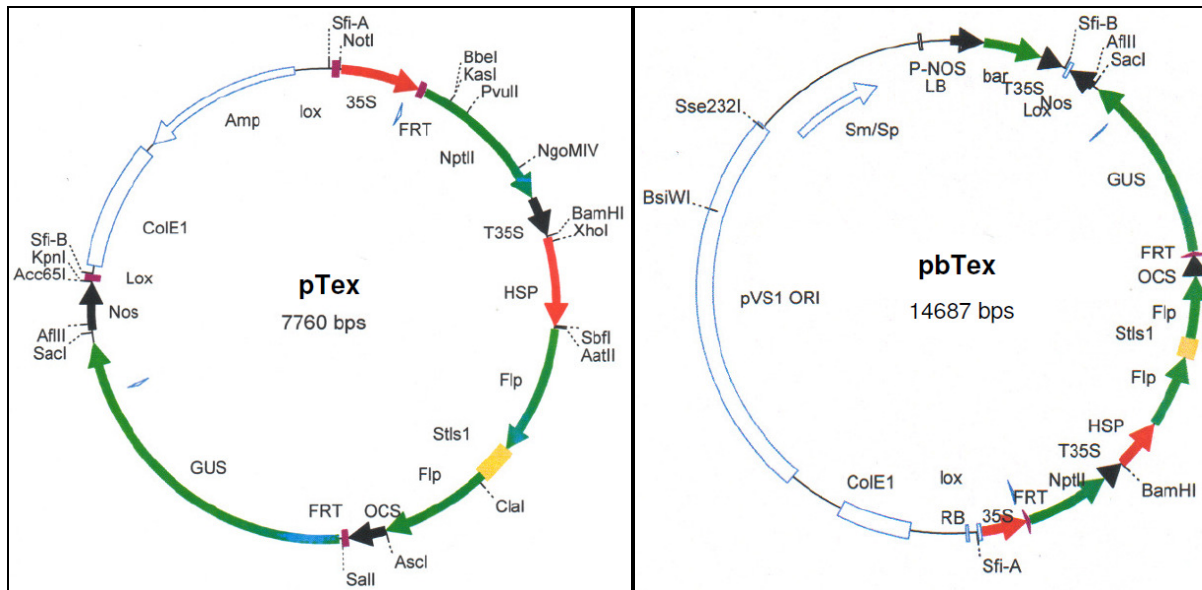
## 3.2 Klonierung der Transformationsvektoren

Die Herstellung der für die biolistische Transformation benötigten Konstrukte wie auch der für die Agrobakterien-vermittelte Transformation benötigten T-DNA für die Exzisions- und Integrationsstudien wurde von DNA-Cloning-Service (Hamburg, D) durchgeführt. Die FLP-Rekombinase wurde unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren Promotors Gmhsp17.5-E exprimiert.

### 3.2.1 Exzisionsvektoren

Für die Erzeugung markerfreier Weizen- und Zitterpappelpflanzen wurde ein Konstrukt verwendet, das aus zwei funktionellen Genabschnitten und einem promotorlosen Reportergen besteht (s. Abbildung 11). Die erste funktionelle Einheit setzt sich aus dem CaMV 35S-Promotor (35S), einer *FRT-site* (FRT), dem Kanamycin-Resistenzgen *nptII* und dem CaMV 35S-Terminator (T35S) zusammen. Daran schließen sich der hitzeinduzierbare Promotor Gmhsp17.5-E, die FLP-Rekombinase aus Hefe (Flp), welche an der Position 2768 nt von dem Intron Stls1 unterbrochen wird und der OCS-Terminator (OCS) an. Hinter der zweiten funktionellen Gensequenz liegt eine zweite *FRT-site* (FRT), der die promotorlose Sequenz der  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) mit dem NOS-Terminator (Nos) folgt.

Dieses Konstrukt wurde für die biolistische Transformation in einen mit dem Restriktionsenzym *SfiI* geöffneten, modifizierten Vektor eingebracht (s. Abbildung 11, pTex, 7760 bp). Für die Transformation mittels des Agrobakterien-vermittelnden DNA Transfers wurde dasselbe Konstrukt in einen ebenfalls mit *SfiI* geöffneten binären Vektor an der rechten T-DNA Grenze (RB) eingebracht (s. Abbildung 11, pbTex, 14.687 bp). Zusätzlich zu dem für die Exzision notwendigen, oben beschriebenen Konstrukt trägt der binäre Vektor pbTex an der linken T-DNA Grenze (LB) ein funktionelles *bar*-Gen, bestehend aus Nos-Promotor, *bar*-Gen und 35S-Terminator, welches aber in den Exzisionsstudien nicht verwendet wurde (s. Abbildung 11, pbTex).



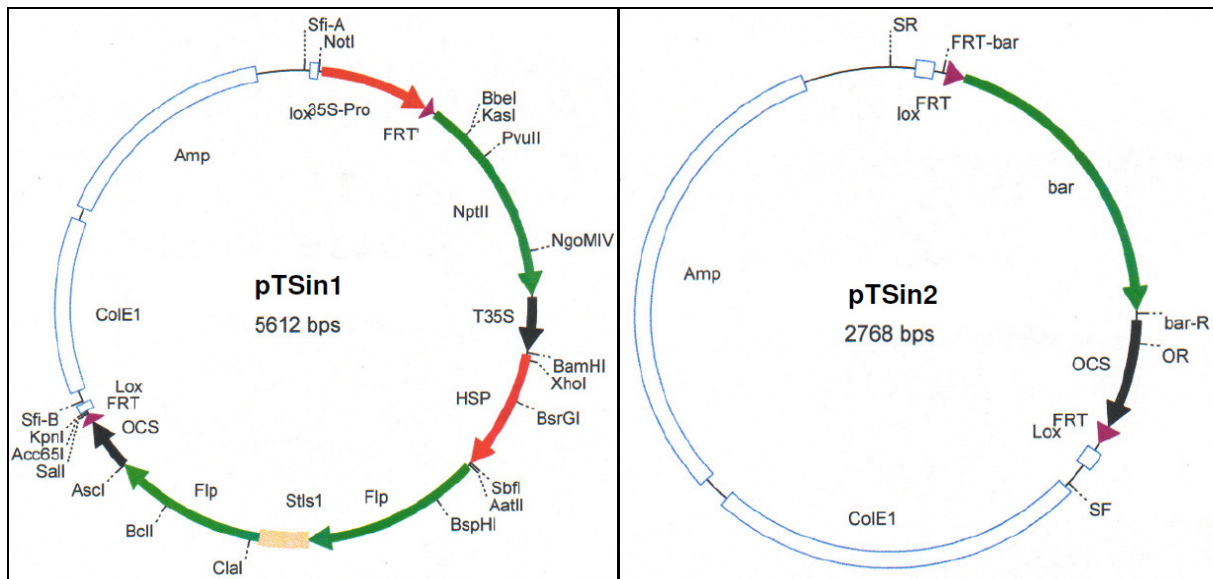
**Abbildung 11: Vektorkarten der Exzisionsvektoren zur biolistischen Transformation von Weizen (pTex) und zur Agrobakterien vermittelten Transformation von Zitterpappel (pbTex).** 35S: 35S-Promotor, FRT: *FRT-site*, NptII: Kanamycin-Resistenzgen, T35S: 35S-Terminator, HSP: Gmhsp17.5-E, Flp: FLP-Rekombinase, Stls1: Intron, OCS: OCS-Terminator, GUS: GUS-Gen, Nos: NOS-Terminator, P-NOS: NOS-Promotor, *bar*: *Bar*-Gen, lox: *lox-site*, RB: rechte Grenze der T-DNA, LB: linke Grenze der T-DNA.

Durch die Aktivierung des FLP-Enzyms in Folge der Hitzeinduktion des Gmhsp17.5-E Promotors soll die Rekombination an den Erkennungsstellen (*FRT-sites*) zu der Exzision des innerhalb der *FRT-sites* liegenden DNA-Abschnitts führen. Wird dieser von den *FRT-sites* umfassende Bereich (nptII, T35S, HSP, FLP und OCS) ausgeschnitten, kommt es zur Bildung eines funktionellen GUS-Gens, bestehend aus dem 35S-Promotor, GUS-Gen und NOS-Terminator.

### 3.2.2 Integrationsvektoren

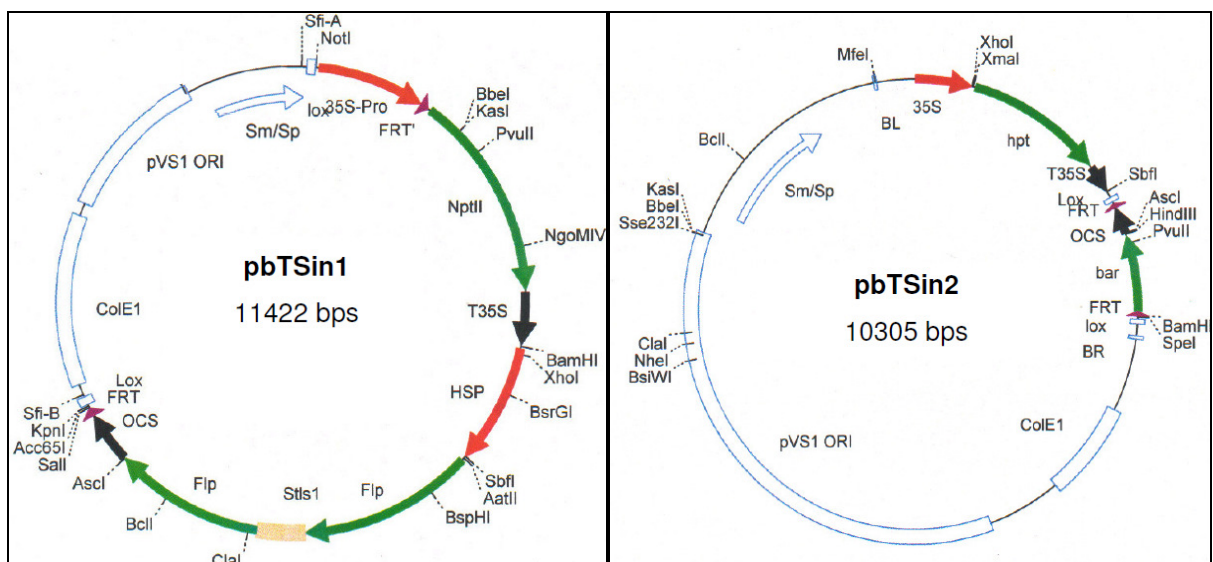
Um eine zielgerichtete Integration in Pflanzen zu untersuchen, werden zwei unabhängige Konstrukte benötigt. Das eine Konstrukt (TSin1) trägt die für die Rekombination nötige FLP-Rekombinase, auf dem anderen Konstrukt (TSin2) liegt von zwei *FRT-sites* flankiert das zum Nachweis der Integration verwendete promotorlose *bar*-Gen.

Das Konstrukt pTSin1 (s. Abbildung 12) ähnelt dem Aufbau des Exzisionskonstruktes (pTex) und enthält die FLP-Rekombinase und das Kanamycin-Resistenzgen. Das Konstrukt pTSin2 (s. Abbildung 12) beinhaltet flankiert von zwei *FRT-sites* ein promotorloses *bar*-Gen mit dem OCS-Terminator.



**Abbildung 12: Vektorkarten der Integrationsvektoren pTSin1 und pTSin2 zur biolistischen Transformation von unreifen Weizenembryonen.** 35S-Pro: 35S-Promotor, FRT: *FRT-site*, NptII: Kanamycin-Resistenzgen, T35S: 35S-Terminator, HSP: Gmhsp17.5-E, Flp: FLP-Rekombinase, Stls1: Intron, OCS: OCS-Terminator, *bar*: *Bar*-Gen, *lox*: *lox-site*.

Das binäre Konstrukt pbTSin1 (s. Abbildung 13) ist ebenso aufgebaut, wie das Konstrukt pTSin1 (s. Abbildung 12). Das Konstrukt pbTSin2 (s. Abbildung 13) enthält zusätzlich zu dem von zwei *FRT-sites* flankierten, promotorlosen *bar*-Gen ein funktionelles Resistenzgen gegen das Fungizid Hygromycin (*hpt*). Diese Hygromycinresistenz dient zur Selektion der doppeltransgenen Zitterpappellinien nach der Transformation mit den beiden Integrationskonstrukten und hat keinen Einfluss auf den Integrationsmechanismus.



**Abbildung 13: Vektorkarten der Integrationsvektoren pbTSin1 und pbTSin2 zur Agrobakterien vermittelten Transformation von Zitterpappelpflanzen.** 35S: 35S-Promotor, FRT: *FRT-site*, NptII: Kanamycin-Resistenzgen, T35S: 35S-Terminator, HSP: Gmhsp17.5-E, Flp: FLP-Rekombinase, Stls1: Intron, OCS: OCS-Terminator, *bar*: *Bar*-Gen, *hpt*: Hygromycin-Resistenzgen, *lox*: *lox-site*, RB: rechte Grenze der T-DNA, LB: linke Grenze der T-DNA.

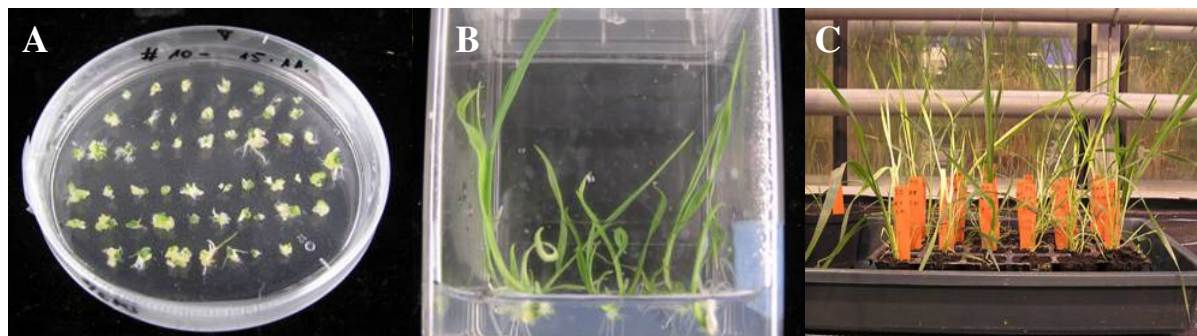
Durch die Aktivierung des FLP-Rekombinationssystems erfolgt die Exzision der beiden von den *FRT-sites* eingegrenzten DNA-Abschnitten beider Vektoren. Da beide DNA-Abschnitte von *FRT-sites* begrenzt sind, kann es nun an diesen Erkennungsstellen vermittelt durch die FLPase durch sequenz-spezifischer Rekombination zu einer Integration des *bar*-Gens aus der T-DNA des Vektors pbTSin2 an die Stelle der T-DNA des Vektors pbTSin1 kommen. Diese interchromosomale Integration hat zur Folge, dass das *bar*-Gen unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotor des Vektors pbTSin1 gerät. Diese neue funktionelle Genkassette verleiht der Pflanze eine Resistenz gegenüber Basta<sup>®</sup>.

### 3.3 Transformationsexperimente

#### 3.3.1 Transformation von Weizen

Für die Exzisionsstudien wurde der Vektor pTex (s. Abbildung 11) mittels biolistischer Transformation nach Becker *et al.* (1994) in unreife Weizenembryonen übertragen. Insgesamt wurden 5950 unreife Weizenembryonen in 17 unabhängigen Transformationsansätzen mit pTex beschossen. Für die Integrationsstudien erfolgten Doppeltransformationen mit den Vektoren pTSin1 und pTSin2 (s. Abbildung 12). Für die Integrationsstudien wurden insgesamt 541 unreife Weizenembryonen in drei unabhängigen Transformationsansätzen mit den beiden Vektoren pTSin transformiert. Nach einer sechs bis achtwöchigen ersten Selektionsphase (s. 2.2.3.1) auf Kanamycin-haltigem Kallusinduktionsmedium (s. Abbildung 14A) wurden die überlebenden Weizenkalli auf Regenerationsmedium überführt (s. Abbildung 14B). Regenerate mit ausreichender Bewurzelung wurden in Erde gepflanzt und im Gewächshaus kultiviert. Dort erfolgte eine erneute Selektion durch Besprühen mit einer 3%-iger Kanamycinlösung. Diese Behandlung hat bei Pflanzen ohne stabile Integration der T-DNA eine Weißfärbung der Blätter und deren Absterben zur Folge, stabil transformierte Pflanzen hingegen zeigen keinerlei Reaktion auf diesen Test (s. Abbildung 14C). Pflanzenlinien, die diese zweite Selektion erfolgreich überstanden haben, wurden weiterkultiviert und für anschließende Southern Blot Analysen herangezogen (s. 3.4.1).





**Abbildung 14: Selektion der biolistisch transformierten Weizenpflanzen.** A: Sich aus Scutellumzellen bildende Kalli auf Selektionsmedium, B: Bewurzelung der jungen Pflanzen, C: erneuter Selektionsschritt durch Sprühtest, Pflanzen ohne stabile Integration färben sich weiß und sterben ab.

Für die Exzisionsstudien wurden insgesamt 36 Regenerate nach ausreichender Bewurzelung in Erde überführt und im Gewächshaus kultiviert. Von diesen überlebte etwa nur die Hälfte den zweiten Selektionsschritt. Bezogen auf die Gesamtanzahl beschossener Weizenembryonen betrug die Rate der ausgepflanzten Regenerate 0,6%. Die Transformationsrate nach der zweiten Selektion lag somit bei 0,3% (s. Tabelle 2). Die Transformationsansätze für die Integrationsstudien erbrachten nur ein Regenerat, welches nach dem zweiten Selektionsschritt abgestorben ist.

**Tabelle 2: Übersicht der Transformationsexperimente von Weizen.**

Konstrukt	Anzahl der beschossenen Embryonen	Anzahl ausgepflanzter Regenerate	Anzahl der Regenerate nach Kanamycinsprühtest	Transformationsrate
pTex	5950	36	19	0,3%
pTSin1 pTSin2	541	1	0	0

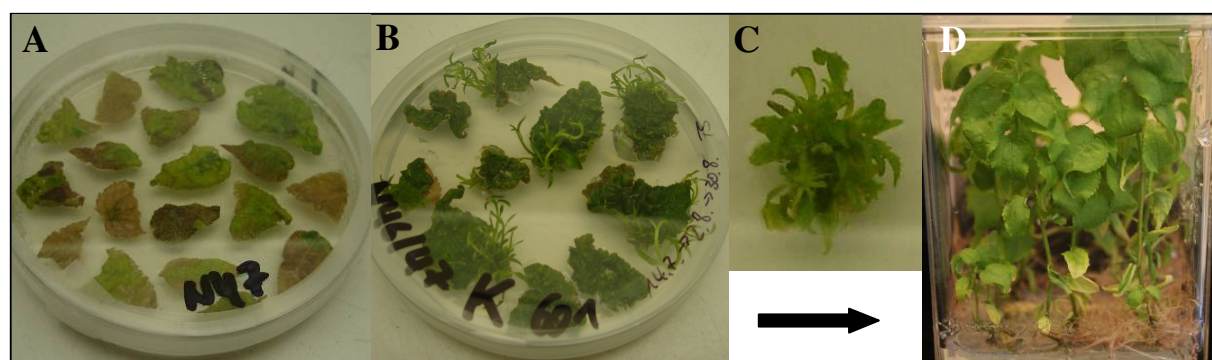
### 3.3.2 Transformation von Zitterpappel

Zitterpappelpflanzen wurden für die Exzisionsstudien mit Hilfe der Blattscheiben-Technik und durch den von Agrobakterien-vermittelten DNA Transfer des Vektors pbTex (s. Abbildung 11) transformiert (s. 2.2.3.2). Insgesamt wurden 1193 Blattscheibenstückchen (s. Abbildung 15A) von Zitterpappeln in fünf unabhängigen Versuchen mit den Agrobakterien beimpft, welche das Plasmid pbTex enthielten. Diese Blattstücke wurden auf Selektionsmedium (601KC) kultiviert und regenerierende Kalli vereinzelt (s. Abbildung 15B). Insgesamt konnten so 27 putativ transgene regenerierende Kalli isoliert werden, diese wurden nach ausreichendem Wuchs (s. Abbildung 15C) in Magentadosen auf 460KC-Medium überführt und vermehrt (s. Abbildung 15D). Vor der Verwendung diese Linien für die

Exzisionsstudien, wurden sie mit Southern Blot Analysen auf vollständige Integration des Exzisionsvektors untersucht (s. 3.4.1).

Für die Integrationsstudien wurden Doppeltransformationen mit beiden Integrationsvektoren pbTSin1 und pbTSin2 (s. Abbildung 13) durchgeführt. Insgesamt wurden 734 Blattstücke in vier unabhängigen Ansätzen gleichzeitig mit beiden Agrobakterienkulturen, welche die T-DNA des Vektors pbTSin1 bzw. pbTSin2 enthielten, beimpft. Diese beimpften Blattstücke (s. 2.2.3.2) wurden auf 601KHC-Medium kultiviert und regenerierende Kalli ebenfalls vereinzelt. Insgesamt konnten so 12 unabhängige putativ doppeltransgene Linien generiert werden. Auch diese Linien wurden zunächst auf vollständige Integration beider Vektoren mit Southern Blot Analysen überprüft (s. 3.5.1).

Anders als bei Weizen wurden die transformierten Zitterpappeln unter ständigem Antibiotika-Selektionsdruck in Gewebekultur gehalten.



**Abbildung 15: Transformation der Zitterpappelblattstücke mit pbTex.** A: Selektion der mit Agrobakterien behandelten Blattstücke auf 601KC-Medium, B: regenerierende Kalli aus Blattgewebe, C: isolierter Zitterpappelspross auf 601KC-Medium, D: Sprosse in Magentadosen mit 460KC-Medium.

Wie in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt konnten für die Exzisionsstudien 27 unabhängige Linien generiert und vermehrt werden; das einer Transformationsrate von 2,3% entspricht. Die Doppeltransformationen führten bei einer Transformationsrate von 1,6% zu insgesamt 12 gegen die Selektionsmarker Kanamycin und Hygromycin resistente, putativ doppeltransgene Linien.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Transformationsexperimente von Zitterpappel.**

Konstrukt	Anzahl beimpfter Blattstücke	Anzahl resistenter Linien	Transformationsrate
pbTex	1193	27	2,3%
pbTSin1 pbTSin2	734	12	1,6%

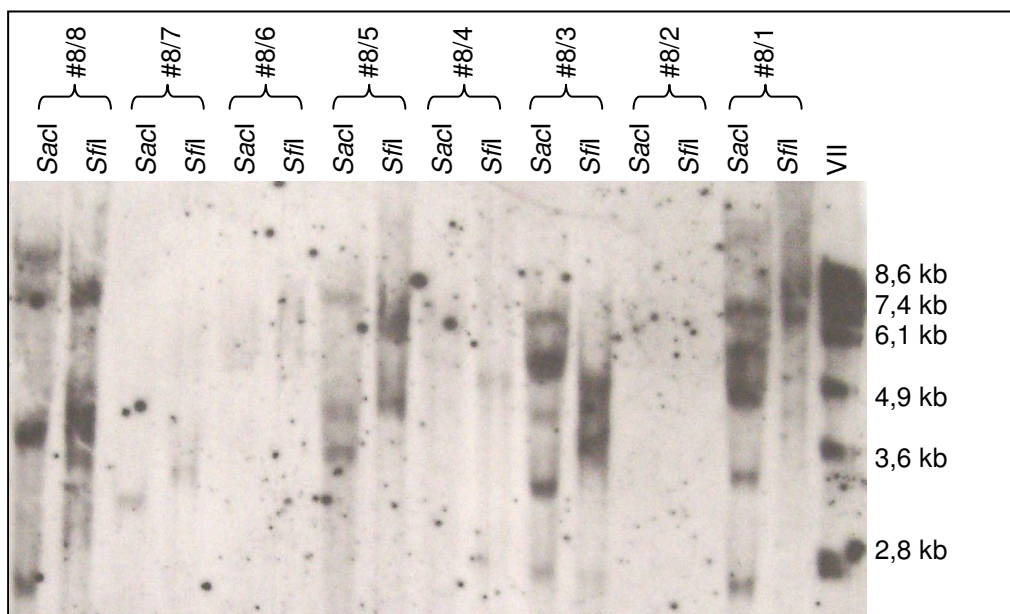
Blätter von größeren Zitterpappelkulturen (s. Abbildung 15D) wurden für DNA-Isolierungen geerntet und durch Southern Blot Analysen auf die vollständige Integration der übertragenen T-DNA und mit PCR-Analysen auf die Integration bestimmter Gensequenzen untersucht.

### 3.4 Exzision

#### 3.4.1 Nachweis der Integration des Exzisionskonstrukts

Voraussetzung für die Exzisionsstudien ist die Integration des vollständigen Exzisionskonstrukts, bestehend aus dem 35S-Promotor, *nptII*-Resistenzgen, FLPase und dem promotorlosem GUS-Gen. Dazu wurden alle erzeugten transgenen Weizen- und Zitterpappellinien mit Southern Blot Analysen auf vollständige Integration des Exzisionskonstrukts und auf Linien untersucht, welche möglichst eine einfache Integration des Vektors aufweisen (*single copy event*). Die Analysen erfolgten bei Weizen und Zitterpappel unter denselben Bedingungen.

##### 3.4.1.1 Weizen

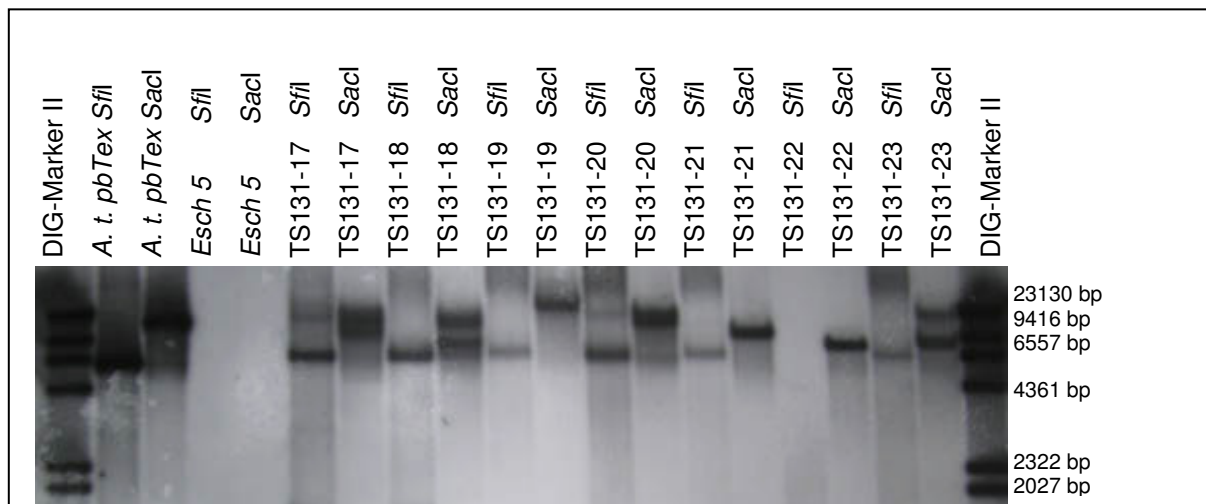


**Abbildung 16: Transgennachweis von pTex in Weizen und dessen Kopienanzahl mittels Southern Blot Analyse.** Es wurden insgesamt 25 µg Weizen-gDNA auf vollständige Integration (*SfiI*) und Kopienanzahl (*SacI*) restringiert und elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer 640 bp großen DIG-markierten GUS-Sonde hybridisiert. Bei vollständiger Integration des pTex-Konstruktes zeigt sich eine 6 kb Bande in der Spur des *SfiI*-Verdaues. #8/1-8: transgene Weizenlinien, VII: DIG-VII Marker, dessen Bandengrößen rechts angegeben sind (8,6 kb – 2,8 kb).

Der Transgennachweis bei den Southern Blot Analysen der biolistisch transformierten Weizenpflanzen erfolgt mit Restriktion durch die Endonuklease *SfiI*. Nach erfolgreicher

Trennung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese und anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran wurden mit einer GUS-spezifischen Sonde (s. 2.2.1.3.4) DNA-Fragmente detektiert. Bei vollständiger Integration der Genkassette sollte eine Bande der Größe 6 kb zu sehen sein. Die Linie #8/5 zeigt neben einer solchen Bande aber auch eine 4,8 kb Bande (s. Abbildung 16). Die anderen Linien zeigen zwar Banden, aber nicht in der für den Transgennachweis richtigen Größenordnung. Die Analyse der Kopienanzahl mittels Restriktion mit *SacI* zeigte in keiner der hier dargestellten Weizenlinien eine einfache Integration (*single copy*). Da die Weizenlinie #8/2 in keiner der beiden Proben eine GUS-spezifische Bande aufweist, gilt sie als nicht-transgen.

### 3.4.1.2 Zitterpappel



**Abbildung 17: Southern Blot Analyse von restringierter Zitterpappel-gDNA** (15 µg) zur Analyse der transformierten Linien (TS131-) auf vollständige Integration (*SfiI*) und Kopienanzahl der integrierten T-DNA des Vektors pbTex (*SacI*). Nach anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte der Nachweis mit einer 640 bp langen DIG-markierten GUS-Sonde. *A. t.*: Plasmidkontrollen, Esch5: Wildtyp, TS131/17-23: transgene Zitterpappellinien

Für den Transgennachweis der Zitterpappellinien wurde ebenfalls mit der Restriktionendonuklease *SfiI* die gesamte Transgenkassette aus dem Pflanzengenom ausgeschnitten. Außer bei der Zitterpappellinie TS131-22 lässt sich jeweils eine Bande von 6 kb erkennen, was der Größe der T-DNA des Vektors pbTex entspricht (s. Abbildung 17). Demnach haben die Linien TS131-17, -18, -19, -20, -21 und -23 die vollständige Genkassette in das Genom integriert. Die Kopienanzahl wurde durch die Restriktion mit *SacI* bestimmt. Dieses Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass es im Genom schneidet, die Genkassette jedoch nur linearisiert. Im Idealfall (*single copy*) sollte nur eine Bande zu sehen sein. Dies ist bei den Linien TS131-19, -20, -21 und -22 der Fall (s. Abbildung 17). Es wurden auch Linien detektiert, welche zwei Banden oder mehr aufzeigen, so wie hier die Linien TS131-17, -18

und -23. Diese Linien weisen Mehrfachkopien des Transgens auf. Der Wildtyp Esch5 zeigt wie erwartet keine Bande, da in der nicht-transgenen Zitterpappellinie kein GUS-Gen vorhanden ist.

Insgesamt konnten so für die Exzisionsstudien 16 stabile unabhängige transgene Weizenlinien mit dem Vektor pTex (s. Abbildung 11) und 23 stabil transformierte Zitterpappellinien und vollständiger Integration der T-DNA des Vektors pbTex (s. Abbildung 11) charakterisiert werden. Die biolistisch transformierten Weizenlinien wiesen alle Mehrfachintegrate der übertragenen Genkassette auf, während bei Zitterpappel neun Linien mit Einfachintegration nachgewiesen werden konnten: TS131-3, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 19 und 22. Diese charakterisierten Linien wurden für die Hitzebehandlung (s. 2.2.4) und die Aktivierung der FLP-Rekombinase ausgewählt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Transgenanalysen bei Weizen und Zitterpappel gibt Tabelle 4.

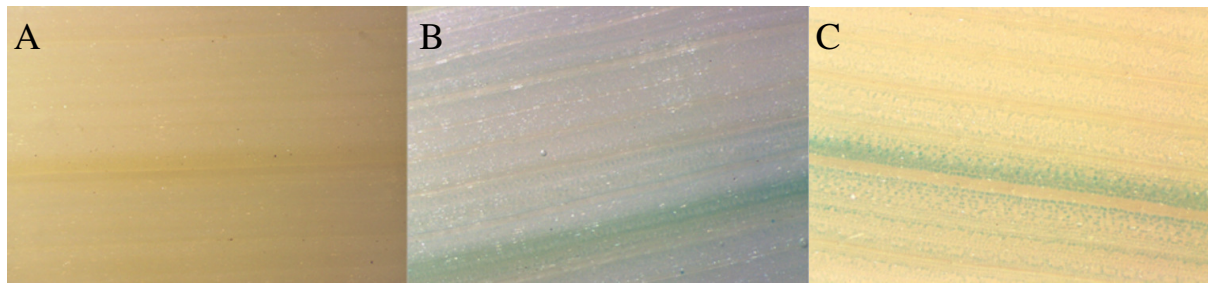
**Tabelle 4: Zusammenfassung der analysierten transgenen Pflanzen bezüglich der Kopienanzahl der Genkassette.** Alle Linien enthalten die vollständige Genkassette mindestens einmal (Mehrfachintegration) oder nur einmal (*single copy* Integration).

	<i>Single copy</i> Integration	Mehrfachintegration
Weizen	-	16
Zitterpappel	10	13

### 3.4.2 Nachweis der Exzision durch GUS-Färbung

Die Hitzeaktivierung der FLPase führt zu einer Exzision des von *FRT-sites* flankierten DNA-Abschnitts. Als Folge der Rekombination gelangt das promotorlose GUS-Gen unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors. Dies lässt sich durch eine GUS-Färbung nachweisen. Einen Tag nach erfolgtem Hitzeschock wurden einzelne Blätter abgeschnitten und mit X-Gluc Färbepuffer bei 37°C inkubiert (s. 2.2.5).

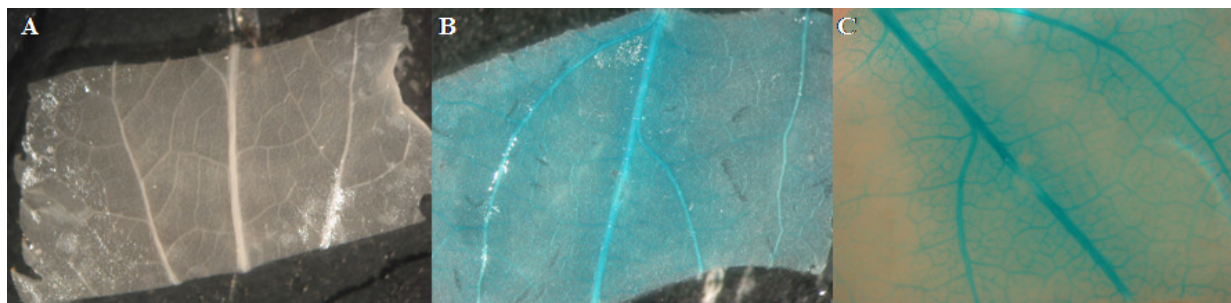
### 3.4.2.1 Weizen



**Abbildung 18: GUS-gefärbte transgene Weizenblätter mit dem Exzisionskonstrukt pTex.** Die Blätter wurden einen Tag nach erfolgter Hitzebehandlung geerntet und mit X-Gluc behandelt. Eine initiale Vakuumbehandlung erfolgte bei 27 inch Hg. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. A: ohne Hitzebehandlung, B und C: nach Hitzebehandlung.

Bei fünf der insgesamt 16 hitzebehandelten Weizenlinien waren Blaufärbungen zu beobachten (s. Abbildung 18). Jedoch war die Farbintensität nicht so deutlich und wesentlich schwächer als bei der Zitterpappel. Außerdem ist eine Mosaikbildung im Färbemuster der Weizenblätter zu erkennen, was daraufhinweist, dass es nur in einzelnen Zellen zu einer erfolgreichen GUS-Gen Aktivierung gekommen ist. Die Kontrollen mit transgenen Weizenblättern ohne Hitzebehandlung zeigten einheitlich keine Färbung (s. Abbildung 18A). Die entsprechenden Blätter mit Hitzebehandlung zeigten dagegen bei erfolgreich stattgefundener Exzision unter dem Mikroskop eine Blaufärbung (s. Abbildung 18B+C). Es gilt hierbei festzuhalten, dass die beobachteten Exzisionsereignisse bei Weizen weit geringer waren, als bei der Zitterpappel. So zeigten nur insgesamt 31% der getesteten Weizenlinien, nämlich die Linien N16/1, 2, 3, 5 und 6 eine positive GUS-Färbung (s. Tabelle 5).

### 3.4.2.2 Zitterpappel



**Abbildung 19: GUS-gefärbte transgene Zitterpappelblätter mit dem Exzisionskonstrukt pbTex.** Die Blätter wurden einen Tag nach erfolgter Hitzebehandlung geerntet und der GUS-Färbung unterzogen. Dazu wurden die Blätter in X-Gluc Färbepuffer gelegt in einem Exzikator Vakuum behandelt und danach über Nacht gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Binokular oder Mikroskop. A: ohne Hitzebehandlung, B+C: nach Hitzebehandlung.

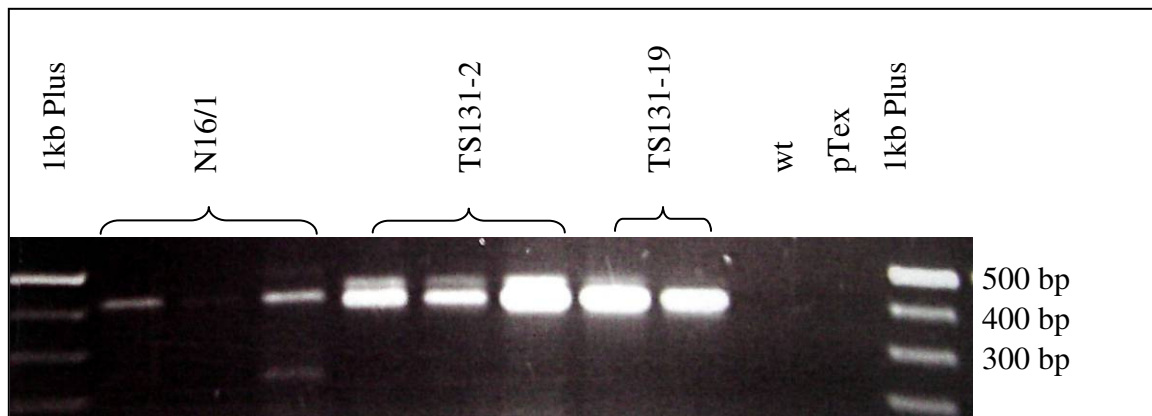
Die Mehrzahl der hitzebehandelten Zitterpappelblätter zeigten eine starke Blaufärbung, was exemplarisch in Abbildung 19 B und C dargestellt ist. Besonders deutlich sichtbar war die Blaufärbung in der Nähe der Leitbahnen der Blätter. Die dortige Farbintensität war mit bloßem Auge erkennbar. Kontrollblätter derselben transgenen Linie, die aber keiner Hitzebehandlung unterzogen wurden, zeigten in keinem Falle eine Blaufärbung (s. Abbildung 19A). Das bedeutet, dass ohne den Hitzeschock keine Aktivierung des Gm<sub>hsp17.5</sub>-E Promotors und somit des FLP-Rekombinationssystems stattgefunden hat. Insgesamt konnten von 23 hitzebehandelten Zitterpappellinien bei 14 eine Blaufärbung beobachtet werden, und zwar bei den Linien TS131-1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11-15, 19 und 22. Das entspricht einer Exzisionsquote von 61%. Die Ergebnisse der GUS-Färbungen von Weizen- und Zitterpappelblättern sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der hitzebehandelten und X-Gluc gefärbten transgenen Pflanzen.**

	Getestete Linien	Linien mit GUS-Signalen
Weizen	16	5 (31%)
Zitterpappel	23	14 (61%)

### **3.4.3 Nachweis der Exzision durch PCR-Analysen bei Weizen und Zitterpappel**

Ob eine Exzision stattgefunden hat, lässt sich auch molekularbiologisch durch PCR-Analysen nachweisen. Dafür wurden eine Weizenlinie (N16/1) und zwei Zitterpappellinien (TS131-2 und TS131-19) ausgewählt. Da die Rekombination zwei weit voneinander entfernt liegende DNA-Abschnitte (35S-Promotor und GUS-Gen) zusammenfügt, wurden die Primer so gewählt (TS29/30, s. 2.1.7e), dass erst nach erfolgreichem Zusammenschluss der beiden DNA-Bereiche ein Amplifikat von 450 bp entsteht (s. Abbildung 20). Im Ausgangszustand, vor der Rekombination würde die zu amplifizierende DNA 3,6 kb betragen.



**Abbildung 20: Nachweis der Exzision mittels PCR-Analyse bei Weizen (N16) und Zitterpappel (TS131).** Als Template für die PCR-Reaktion wurden 75, 150 bzw. 200 ng gDNA eingesetzt, um eine sichere Amplifikation zu gewährleisten. Wt: Wildtyp Weizen-DNA, pTex: Plasmid-DNA, 1kb Plus: Marker DNA Ladder

Die einzelnen Spuren in Abbildung 20, durch Klammern zu einer Probe zusammengefasst, unterscheiden sich nur in der eingesetzten DNA-Konzentration in der PCR. Bei den beiden Negativkontrollen (wt und Plasmid pTex) war kein Amplifikat mit der erwarteten Größe zu sehen. Bei den transgenen Linien (Weizen, N16; Zitterpappel, TS131) war jedoch eine Bande von 450 bp nachweisbar.

### 3.4.4 Nachweis der Exzision durch Sequenzanalysen bei Weizen und Zitterpappel

Das 450 bp große Fragment der PCR-Analyse (s. Abbildung 20) muss jedoch nicht zwingend durch Exzision der zwischen den *FRT-sites* befindlichen DNA zustande gekommen sein. Um sicherzustellen, dass diese Banden tatsächlich den theoretischen, durch das Rekombinationsereignis zustande kommenden entsprechen, wurden die PCR-Amplifikate zusätzlich sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen zeigten den Übergang vom 35S-Promotor in das GUS-Gen mit der dazwischen liegenden *FRT-site*. Die Sequenzierung lieferte einen weiteren Hinweis, dass es tatsächlich zur Exzision des von den *FRT-sites* flankierten DNA-Abschnitts gekommen ist, also der Exzision des *nptII*-Gens und der FLP-Rekombinase (s. Abbildung 4).



TS131-19	....GGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACAT	AAGGGACTGACTAGTCGAC	GAA
TS131-19	G TTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC	GTCCTCTCCAAATGAAAT	.....
TS131-2	....GGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACAT	AAGGGACTGACTAGTCGAC	GAA
TS131-2	G TTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC	GTCCTCTCCAAATGAAAT	.....
N16/1	....GGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAAC	GGCCGGCTTTGTATTTGTATTTATC	
N16/1	AGCACACAATAAATACACATTTTCTAAAACGGATCCA	ACTAGT	GTCCTCTCCA
N16/1	AATGAAAT	.....	
Legende: GUS-Gen FRT-site 35S-Promotor unbekannte Sequenz			

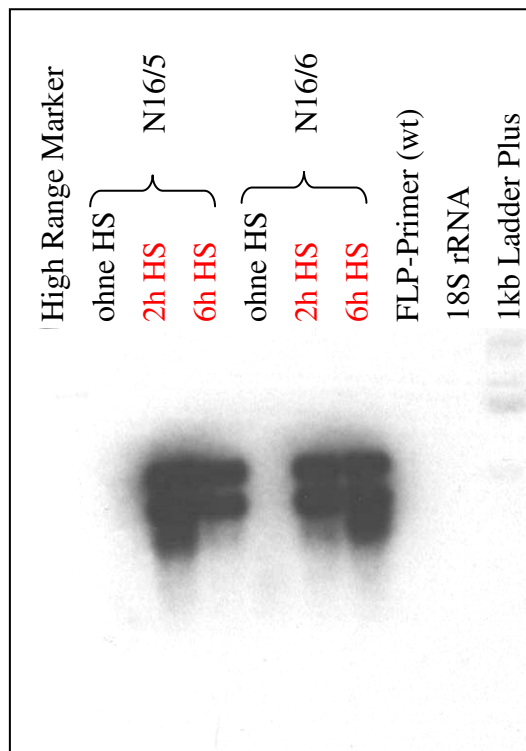
**Abbildung 21: Sequenzanalyse der PCR-Produkte hitzebehandelter DNA.** Der Übergang des 35S-Promotors in das GUS-Gen, welcher durch die Exzision der von *FRT-sites* flankierenden DNA zustande kommen sollte, ist verifiziert bei den Zitterpappellinien (TS131) verifiziert. Bei der Weizenlinie (N16) ist der 35S-Promotor und das GUS-Gen von einer unbekannt DNA-Sequenz unterbrochen.

Die Zitterpappellinien (TS131) zeigten eine korrekte Nukleotidsequenz, so wie sie bei einer Rekombination an den *FRT-sites* durch die FLP-Rekombinase erwartet wird. Beim Weizen (N16) jedoch wurden das GUS-Gen und der 35S-Promotor von einer unbekannt DNA-Sequenz unterbrochen, die weder Homologien mit der *FRT-site* oder mit Teilen der Vektorsequenz aufweist, noch konnten durch BLAST-Datenbankrecherchen anderweitige Homologien gefunden werden. Jedoch stellen die angrenzenden Vektorbereiche auch hier den Übergang des 35S-Promotors in das GUS-Gen dar, was ebenfalls auf eine stattgefundene Rekombination hinweist: in der ursprünglichen DNA-Sequenz folgt nach dem 35S-Promotor das *nptII*-Resistenzgen und vor dem GUS-Gen befindet sich die *FRT-site*.

### 3.4.5 Transkriptionsanalyse der FLP-mRNA bei Weizen

Da die Exzision des Kanamycinresistenzgens bei den Weizenlinien in dieser Arbeit durch Southern Blot Analysen nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, sollte auf RNA-Ebene untersucht werden, ob die Aktivierung der Transkription des FLP-Gens durch den hitzeinduzierbaren Promotor Gmhsp17.5-E überhaupt stattfindet. Dafür wurden transgene Weizenpflanzen unterschiedlich lang der Hitzebehandlung ausgesetzt (s. Abbildung 22, 2 und 6 Stunden) und danach deren RNA mittels RT-PCR (s. 2.2.1.3) unter Verwendung der Primer AatF und F1R (s. 2.1.7g) nach vorhandener FLP-mRNA untersucht. Diese erzeugten Amplifikate wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf

eine Nylonmembran mit einer radioaktiv-markierten FLP-Sonde hybridisiert (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22: Nachweis der FLP-mRNA in Weizen nach Hitzebehandlung.** Ausgehend von Gesamt-RNA wurde mittels RT-PCR eine cDNA-Synthese der FLPase (Primerpaar TS31/32) durchgeführt und anschließend die elektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten FLP-Sonde (700bp) hybridisiert. HS: Hitzeschock, FLP-Primer (wt): Wildtyp-Weizen-DNA mit FLP-Primern, 18S rRNA: Wildtyp-Weizen-DNA mit 18S rRNA Primern (Kontrolle)

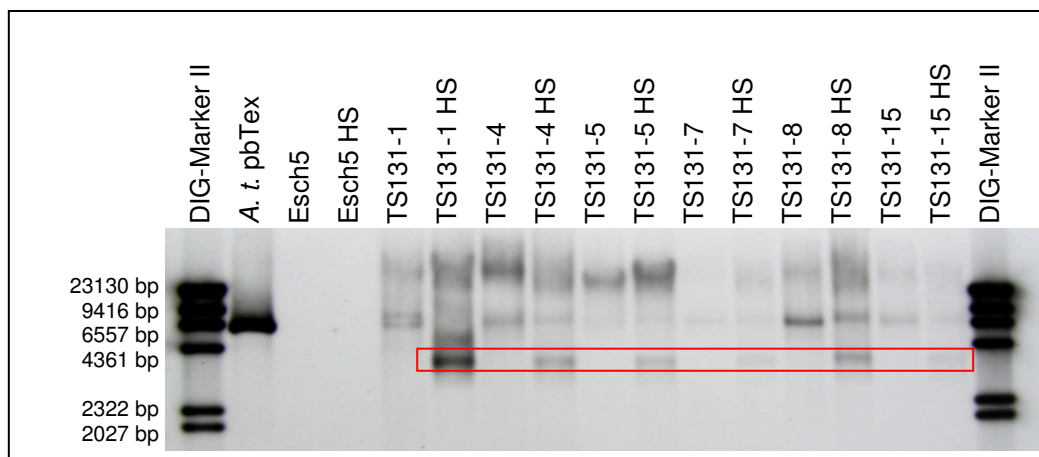
Abbildung 22 zeigt, dass vor dem Hitzeschock keine FLP-mRNA gebildet wurde (ohne HS). Erst nach der Hitzeschockeinwirkung (2 und 6 Stunden) ist die FLP-mRNA nachweisbar. Durch die Hybridisierung der DNA mit der FLP-Sonde wurden nur die Banden detektiert, die der FLP-Sequenz entsprechen. Jedoch sind bei den hitzebehandelten Proben zwei bzw. drei Banden zu sehen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Spleißen des Introns aus der Rekombinasensequenz. Die prä-mRNA ist um 200 bp länger als die gespleißte mRNA (700 bp).

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurden konservierte, konstitutiv exprimierte Bereiche des Weizengenoms (18S rRNA) amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-Weizen DNA (FLP-Primer, wt) mit demselben Primerpaar (AatF und F1R) in der PCR eingesetzt wie auch bei den transgenen hitzebehandelten DNA Proben. Die Primer ergaben hier kein PCR-Produkt, da die FLP-Primer im Wildtyp Weizengenom nicht binden.

Die sichtbaren FLP-Banden des Southern Blots sind ein zusätzlicher Hinweis dafür, dass die FLPase tatsächlich durch den Hitzeschock aktiviert wurde.

### 3.4.6 Nachweis der Exzision durch Southern Blot Analysen bei Zitterpappel

Die Exzision des Markergens *nptII* konnte bei den transgenen Zitterpappellinien mittels Southern Blot Analysen nachgewiesen werden. Die durch die Aktivierung des FLP-Rekombinationssystems modifizierte DNA ist um 3,2 kb kürzer als die eingeführte DNA-Sequenz. Da jedoch sowohl das durch den Hitzeschock modifizierte als auch das original transformierte Genkonstrukt das GUS-Gen enthalten, sollte eine Identifizierung der beiden Konstrukte mit einer DIG-markierten GUS-Sonde (s. 2.2.1.3.4) möglich sein. Dazu wurde mit *SfiI* die Genkassette ausgeschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend geblottet. Nach Hybridisierung mit der GUS-spezifischen Sonde konnte in den hitzebehandelten Proben eine kürzere Bande (2,8 kb) als die Originalbande (6 kb) detektiert werden (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23: Southern Blot Analyse mit gDNA aus Zitterpappel, mit und ohne Hitzeschock (HS).** Es wurden 15 µg gDNA von hitzebehandelten (HS) und nicht-hitzebehandelten Zitterpappellinien mit *SfiI* restringiert, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit einer DIG-markierten GUS-spezifischen DNA-Sonde der Größe 580 bp hybridisiert. Nur bei hitzebehandelten Proben ist eine Bande von 2,8 kb detektiert (rot markiert). Diese entspricht der Größe des modifizierten Genkonstrukts nach Exzision der von *FRT-sites* flankierten DNA. Esch5: Wildtyp, A. t.: Plasmid-DNA

Es lässt sich in allen hitzebehandelten Proben eine Bande von 2,8 kb (rot markiert) erkennen, die in den nicht hitzebehandelten Kontrollproben nicht vorhanden ist (s. Abbildung 23). Einzig die Linie TS131-1 zeigt nach dem Hitzeschock keine Bande der Größe 6 kb. Die anderen Linien weisen auch in den hitzebehandelten DNA-Proben noch das ursprüngliche Genkonstrukt auf, wenn auch stets mit einer geringeren Bandenintensität als vor dem Hitzeschock. Die Wildtypproben des Zitterpappelklons Esch5 zeigen sowohl vor als auch nach dem Hitzeschock keine Banden. Die Plasmidkontrolle (At. pbTex) zeigt nur die 6 kb Bande an, welche bei den transgenen Linien der nicht-modifizierten Genkassette entspricht.

### 3.5 Integration

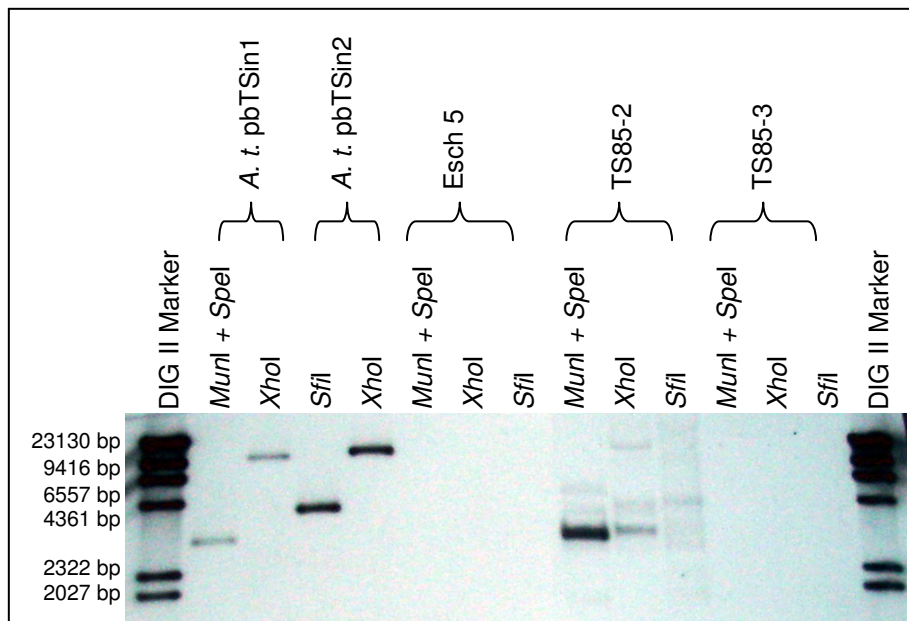
Der Mechanismus des FLP-Rekombinationssystems soll hier möglichst so verwendet werden, um neben der Exzision des Markergens eine nachträgliche zielgerichtete Integration von Transgenen an einen durch *FRT-sites* definierten Locus im Pflanzengenom zu ermöglichen. Hierbei sollte durch die Aktivierung der FLP-Rekombinase einerseits die Exzision der von *FRT-sites* flankierter DNA erfolgen (s. Exzision), andererseits gleichzeitig von *FRT-sites* flankierte Fremd-DNA an dieser Stelle des Genoms integriert werden (s. 1.5).

Für diesen Zweck wurden Zitterpappelpflanzen sowohl mit dem Vektor pbTSin1 als auch mit pbTSin2 (s. Abbildung 13) transformiert. Diese Linien wurden zunächst mittels Southern Blot Analysen auf vollständige Integration und Kopienzahl untersucht (s. 3.5.1).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine stabil transformierte doppeltransgene Weizenlinie zur Untersuchung der Integration hergestellt werden, deshalb beschränken sich die Untersuchungen zur zielgerichteten Integration von Transgenen auf die unter 3.3.2 beschriebenen Zitterpappellinien.

#### 3.5.1 Transgennachweis der Integrationskonstrukte bei Zitterpappel

Um die vollständige Integration des Vektors pbTSin1 in das Pflanzengenom zu überprüfen, wurde die isolierte gDNA mit *Sfi*I verdaut. Für die Untersuchung der vollständigen Integration des Vektors pbTSin2 wurde die gDNA mit *Mun*I und *Spe*I restringiert. Als Folge beider Restriktionen wurde ein definierter Transgenabschnitt bekannter Größe aus der gDNA herausgeschnitten. Bei erfolgreicher Integration der Vektoren sollten diese bekannten DNA-Fragmente nach Hybridisierung mit einer DNA-Sonde auf dem Röntgenfilm detektierbar sein. Linien mit vollständiger Integration beider Vektoren sollten in der *Sfi*I behandelten Probe eine Bande von 3,8 kb und in der Probe, welche mit *Mun*I und *Spe*I behandelt wurde, eine Bande von 2,9 kb aufweisen (s. Abbildung 24). Der Nachweis dieser DNA-Fragmente erfolgt mit einer DIG-markierten 35S-spezifischen Sonde (s. 2.2.1.3.4), da beide Vektoren den 35S-Promotor enthalten. Die Kopienanzahl der Vektoren wurde durch Restriktion mit *Xho*I überprüft, da es nur einmal in der übertragenen T-DNA schneidet. Aus der Anzahl der detektierbaren Banden lässt sich die Kopienanzahl der Integrationsvektoren bestimmen.



**Abbildung 24: Southern Blot Analyse doppeltransgener Zitterpappellinien.** Restriktion mit *MunI* + *SpeI* dient zum Transgennachweis (2,9 kb) von pbTSin2. Die Restriktion mit *SfiI* weist das Konstrukt pbTSin1 (3,8 kb) nach. Restriktion mit *XhoI* analysiert die Konienanzahl der Integrate. *A. t.*: *Agrobacterium tumefaciens* mit entsprechendem Vektor, Esch5: Wildtyp Zitterpappel DNA, TS85: doppeltransgene Zitterpappellinien

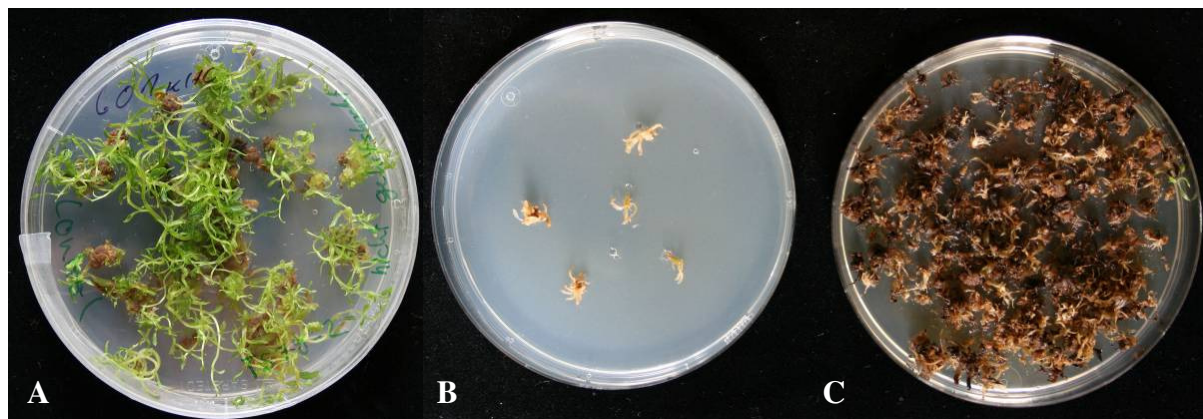
Wie in Abbildung 24 exemplarisch dargestellt, zeigte die Linie TS85-2 alle oben beschriebenen, zu erwartenden Banden. Die mit *MunI* und *SpeI* restringierten DNA-Proben wiesen sowohl in der transgenen Linie TS85-2 als auch in der Plasmidkontrolle pbTSin1 die erwartete Bande von 2,9 kb auf. Der *SfiI* Verdau des Plasmids pbTSin2 und der Linie TS85-2 zeigt in beiden Fällen eine Bande von 3,8 kb. Somit besitzt die Linie TS85-2 beide Vektoren vollständig und kann als erfolgreich doppeltransformierte Linie für die Integrationsstudien eingesetzt werden. Als Positivkontrolle ist auch die DNA aus den *Agrobacterium tumefaciens* Stämmen (*A. t.*), welche den angegebenen Vektor pbTSin1 bzw. pbTSin2 tragen, analysiert worden. Die nicht transgene Zitterpappellinie Esch5 und die Linie TS85-3 besitzen keine DNA-Fragmente, welche mit der 35S-Sonde hybridisieren. Die generierte Linie TS85-3 erweist sich durch diese Southern Blot Analyse als nicht transgen. Insgesamt ließen sich von den 12 generierten, gegen Kanamycin und Hygromycin resistenten Zitterpappellinien 9 als tatsächlich mit beiden Integrationsvektoren als doppeltransgen bestimmen. Acht von diesen Linien wurden für die Aktivierung der FLP-Rekombinase und die Integrationsstudien eingesetzt, und zwar die Linien TS71-1 bis -3, TS79-1, -2, -4, -5, TS85-1 und -2.

### 3.5.2 Aktivierung der FLP-Rekombinase in doppeltransgenen Zitterpappellinien

Insgesamt wurden acht erfolgreich mit den Vektoren pbTSin1 und pbTSin2 transformierte doppeltransgenen Zitterpappellinien zur Aktivierung des FLP-Rekombinationssystems verwendet (s. Tabelle 6, Seite 57).

Zunächst wurden die Linien auf 601KHC-Medium vermehrt, so dass genügend Material für die Hitzeaktivierung bei 42°C für sechs Stunden zur Verfügung stand. Der Hitzeschock und die anschließenden Versuche wurden in zwei getrennten Ansätzen mit je vier Linien durchgeführt. Die hitzebehandelten Linien wurden einen Tag nach dem Hitzeschock in möglichst kleine max. 1-2mm große Mikro-Kalli zerkleinert, auf neuem Basta® haltigem Selektionsmedium (601HBC) ausgestrichen und in der Klimakammer unter Standardbedingungen (s. 2.1.4) kultiviert. Die Anzahl der zerkleinerten ausgestrichenen Pflanzenstücke je Linie variiert zwischen 16.422 und 51.392 (s. Tabelle 6).

Als Kontrollen wurden von jeder Zitterpappellinie Pflanzen und Kallusgewebe, welches nicht hitzebehandelt wurde, auf 601KHC- und auf 601HBC-Medium überführt, und zudem hitzebehandeltes Gewebe auf ursprünglichem Selektionsmedium 601KHC belassen.

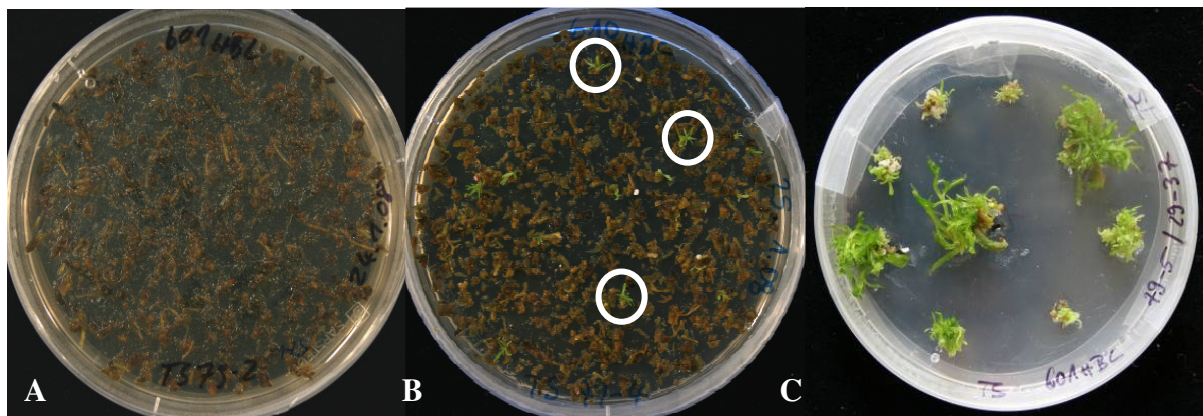


**Abbildung 25: Kontrollen doppeltransgener Zitterpappellinien (pbTSin1+2) zur Überprüfung der Integrationsbedingungen.** A: Kalli auf 601KHC-Medium ohne HS, B: Kalli auf 601HBC-Medium ohne HS, C: Hitzebehandelte Kalli auf 601KHC-Medium

Bei nicht hitzebehandeltem Pflanzengewebe sollte es zu keiner Rekombination und damit auch zu keiner Neukombination der Antibiotika-Resistenzgene gekommen sein. Tatsächlich ließ sich bei allen Kontrollen der acht Linien das Absterben des nicht hitzebehandelten Pflanzengewebes auf dem neuen Selektionsmedium 601HBC beobachten (s. Abbildung 25B). Wurden dagegen die Mikro-Kalli auf dem ursprünglichen Selektionsmedium (601KHC) belassen, entwickelten sich die Pflanzen ohne Einschränkungen (s. Abbildung 25A). Wurde

jedoch hitzebehandeltes Pflanzengewebe nicht auf neues Selektionsmedium (601HBC) überführt, sondern auf dem alten 601KHC-Medium belassen, kam es zu einem fast vollständigen Absterben der Kontrollen bei allen Linien im Laufe des beobachteten Zeitrahmens von vier Monaten (s. Abbildung 25C).

Es gilt also festzuhalten, dass die auf neues Selektionsmedium (601HBC) überführten hitzebehandelten stark zerkleinerten Pflanzenstücke nur dann regenerierende Kalli ausbilden und Pflanzen regenerieren, wenn das promotorlosen *bar*-Gen durch die ausgelöste Rekombination in eine funktionelle genregulatorische Sequenz gelangt (s. Abbildung 5). Tatsächlich lassen sich in den durchgeführten Integrationsstudien der acht verwendeten Zitterpappellinien (s. Tabelle 6) Regenerate beobachten, die nach der Hitzebehandlung auf dem neuen Selektionsmedium (601HBC) wachsen (s. Abbildung 26).



**Abbildung 26: Selektion modifizierter transgener Zitterpappellinien auf 601<sub>HBC</sub>-Medium.** A: absterbendes nicht erfolgreich induziertes Pflanzenmaterial, B+C: regenerierende durch Rekombination modifizierte und dadurch wachstumsfähige Kalli [B: kleine Kalli eingekreist, C: größere Sprosse für DNA-Isolierung kultiviert]

Bei dem Großteil des ausgestrichenen hitzebehandelten Pflanzenmaterials wurde bereits nach vier Wochen ein Absterben beobachtet (s. Abbildung 26A). Nach drei bis fünf Wochen wurden aber auch einzelne hellgrüne Kalli gezählt (s. Abbildung 26B). Daraus entwickelten sich in der Mehrzahl dunkelgrüne und regenerierende Kalli (s. Abbildung 26C). Nach 6-8 Wochen waren die meisten Kalli groß genug, dass das Material für eine DNA-Isolierung und PCR-Tests genutzt werden konnte.

Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der Integrationsversuche zusammen. Sie zeigt die Anzahl der ausgestrichenen Pflanzenstücke der einzelnen Linien und die Gesamtzahl der regenerierten Kalli, welche bei allen Linien vier Monate nach Ausstreichen der Pflanzenstücke auf Basta<sup>®</sup>-haltiges Selektionsmedium bestimmt wurde.

**Tabelle 6: Übersicht der ausgestrichenen Pflanzenstücke und der daraus regenerierenden Kalli pro Linie.**

Zitterpappel- linie	Ausgestrichene Pflanzenstücke	Regenerierte Kalli	Prozentualer Anteil aller ausgestrichenen Pflanzenstücke, die Kalli gebildet haben
TS71-1	42.088	45	0,1%
TS71-3	51.392	244	0,5%
TS79-1	39.663	2.946	7,4%
TS79-2	25.939	0	0
TS79-4	23.814	485	2,0%
TS79-5	31.058	372	1,2%
TS85-1	39.003	412	1,1%
TS85-2	16.422	190	1,2%

Die meisten regenerierenden Kalli wies die Linie TS79-1 auf. Bei dieser Linie regenerierten aus 39.663 ausgestrichenen Pflanzenstücken 2.946 Kalli, was einem Prozentsatz von 7,4% entspricht (s. Tabelle 6). Auf der anderen Seite zeigt jedoch die Linie TS79-2 keinerlei regenerierende Kalli. Nach dem beobachteten Zeitrahmen von vier Monaten waren sämtliche ausgestrichene Pflanzenstücke dieser Linie auf dem 601HBC-Medium nekrotisch und abgestorben. Auch die Linien TS71-1 und TS71-3 zeigten mit einem prozentualen Anteil von weniger als 0,5% aller ausgestrichenen Pflanzenstücke eine sehr geringe Kallibildung. Die meisten anderen hitzebehandelten Linien TS79-4, TS79-5, TS85-1 und TS85-2 wiesen eine Kallibildung von 1-2% aller ausgestrichenen Pflanzenstücke auf. Insgesamt zeigte sich eine geringere Ereignishäufigkeit der erfolgreichen Integration, als bei der Exzision gezeigt wurde. Es lässt sich festhalten, dass sich im Rahmen der durchgeführten Integrationsstudien bei sieben von acht hitzebehandelten Linien erfolgreich regenerierende Kalli gebildet haben.

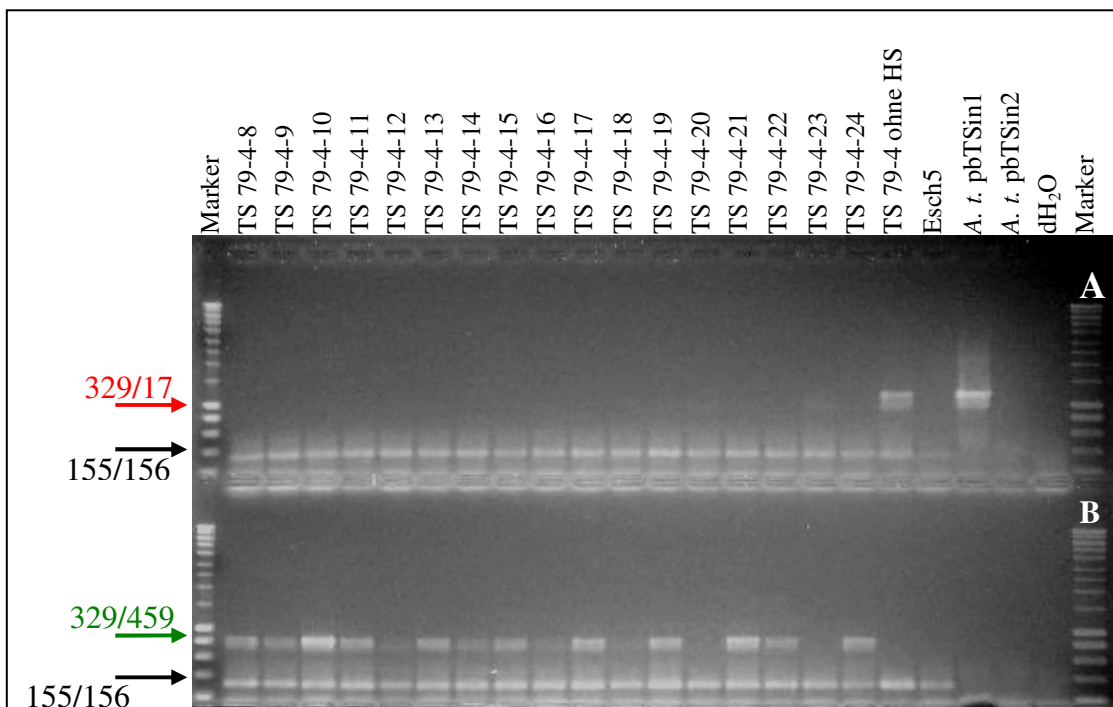
Jedoch ist die Regeneration auf dem Basta<sup>®</sup>-haltigen Selektionsmedium 601HBC alleine noch kein ausreichender Beweis dafür, dass es auch tatsächlich zu einer vollständigen Rekombination und Integration des *bar*-Gens hinter den 35S-Promotor gekommen ist. Dazu wurden zusätzliche PCR-Analysen mit gDNA der isolierten Regenerate durchgeführt.

### 3.5.3 Nachweis der Integration durch PCR-Analysen

Einige zufällig ausgewählte auf Basta<sup>®</sup>-haltigem Selektionsmedium regenerierte Kalli wurden subkultiviert und mittels PCR auf das neu modifizierte Genkonstrukt untersucht (s. Tabelle 7, S. 60). In der dafür angewendeten Multiplex-PCR (s. 2.2.1.3) wurden zusätzlich zu den spezifischen Primern (329/17, 329/459) auch genomische Primer (155/156) gegen



Teilsequenzen des Zitterpappelgenoms (M. Fladung, VTI, Großhansdorf, nicht publiziert) zur endogenen Kontrolle der PCR-Reaktion eingesetzt. Das genspezifische Primerpaar 329/459 (s. Abbildung 27B) ergibt erst nach erfolgreicher Integration des *bar*-Gens hinter den 35S-Promotor ein PCR-Produkt der Größe 800 bp. Tatsächlich lässt sich in der unten dargestellten PCR-Reaktion bis auf zwei Ausnahmen (TS79/4-20 und -23) das erfolgreich modifizierte Genkonstrukt identifizieren. Die Primer 329/17 (s. Abbildung 27A) binden im 35S-Promotor und im Resistenzgen *nptII*, welches im ursprünglichen Zustand vor der Hitzebehandlung ein Produkt, nach dem Hitzeschock jedoch kein Amplifikat ergeben darf. Dies ist eine zusätzliche Kontrolle, um zu überprüfen, ob die Exzision des von *FRT*-sites flankierenden DNA-Abschnitts, welcher sowohl das *nptII*-Gen als auch die FLPase enthält, vollständig stattgefunden hat. Tatsächlich ließen sich auch Fälle beobachten, in denen zwar das *bar*-Gen an seiner neuen Position hinter dem 35S-Promotor rekombinierte (Primer 329/459), dennoch konnte das *nptII*-Gen an dieser Position hinter dem 35S-Promotor (Primer 329/17) lokalisiert werden.



**Abbildung 27: Detektion des modifizierten Genkonstrukts durch PCR-Analyse.** Block A und B enthalten untereinander jeweils die gleichen Proben. Die PCR mit den genomischen Primer (155/156) dient als endogene Kontrolle (250 bp). Die Primer 329/17 binden im 35S-Promotor und *nptII*-Gen und ergeben nur vor der Rekombination eine Bande von 1,2 kb. Das Primerpaar 329/459 bindet im 35S-Promotor und im *bar*-Gen, was nur nach erfolgreicher Integration ein Amplifikat ergeben darf (800 bp). 8-24 bezeichnen die einzelnen Kalli der Linie TS79-4, Esch5: Wildtyp, A. t. pbTSin1+2: Plasmidkontrollen, HS: Hitzeschock

Das Primerpaar 329/17 bindet nur auf der T-DNA des Vektors pbTSin1 erfolgreich. Die Primerkombination 329/459 bindet auf keiner ursprünglichen T-DNA. Der Vektor pbTSin2 enthält zwar sowohl den 35S-Promotor, welcher den Hygromycin-Selektionsmarker kontrolliert, als auch das *bar*-Gen, jedoch in reverser Orientierung, so dass kein PCR-Produkt entstehen kann (s. Abbildung 6, Abbildung 13). Erst nach erfolgreicher Integration des *bar*-Gens hinter den 35S-Promotor des Konstrukts pbTSin1 ist ein Amplifikat mit diesen Primern möglich. In Abbildung 27 zeigten fast alle isolierten Kalli eine vollständige Exzision des *bar*-Gens aus dem alten Genomlocus (Block A). Außerdem weisen die PCR-Ergebnisse in Block B auf eine erfolgreiche Integration hin. Lediglich die Proben der Kalli 20 und 23 zeigten dabei ein gegensätzliches Bild. Als Negativkontrolle wurde außerdem 20 µg gDNA der Wildtyp Zitterpappellinie Esch5 als Template in den Ansatz der PCR eingesetzt. In dieser Probe ergeben nur die genomischen Primer in Block A und B (s. Abbildung 27) eine Bande von 250 kb. In den Plasmidkontrollen (*A. t.*) sind daher keine genomischen Bandenmuster zu erkennen.

Eine Zusammenfassung aller PCR-Ergebnisse zur Integration gibt Tabelle 7. Darin wird aufgelistet, wie viele Kalli der einzelnen Linien mit der oben beschriebenen Multiplex-PCR getestet wurden und wie viele davon eine positive 35S/*bar* Bande zeigten. Neben den absoluten Zahlen sind auch die Prozentwerte angezeigt. Zum einen ist angegeben, in wie vielen Fällen der durchgeführten PCR-Analysen eine Rekombination des *bar*-Gens festgestellt werden konnte. Bei der Linie TS79-1 bedeutet das, dass von den 100 durchgeführten PCR-Analysen 86 ein Integrationsereignis zeigten (86%). Zum anderen wurden die Anzahl der positiven PCR-Ergebnisse auf die Gesamtzahl der ausgestrichenen Pflanzenstücke bezogen. Um die Integrationsrate bezogen auf die Gesamtmenge aller ausgestrichenen Pflanzenstücke darstellen zu können, muss zusätzlich der prozentuale Anteil aller ausgestrichenen Pflanzenstücke, die Kalli gebildet haben, berücksichtigt werden, zumal nicht alle ausgestrichenen Pflanzenstücke Regenerate entwickelt haben. Im Falle der Linie TS79-1 heißt das, dass sich in nur 7,4% der Fälle Regenerate gebildet haben (s. Tabelle 6) und in nur 86% dieser Regenerate eine Integration erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Die Integration des *bar*-Gens erfolgte somit in 6,4% ( $=7,4\% \times 0,86$ ) aller ausgestrichenen Pflanzenstücke dieser Linie.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Integrationsergebnisse ermittelt durch PCR-Analysen.**

Zitterpappel- linie	Anzahl der analysierten Kalli	Anzahl positiver PCR	Prozentsatz	Integrationsereignis bezogen auf die Gesamtmenge aller ausgestrichenen Pflanzenstücke
TS71-1	3	2	66%	0,1%
TS71-3	21	10	47%	0,2%
TS79-1	100	86	86%	6,4%
TS79-2	-	-	-	-
TS79-4	100	70	70%	1,4%
TS79-5	85	46	54%	0,7%
TS85-1	20	4	20%	0,2%
TS85-2	15	2	13%	0,2%

Insgesamt bestätigte sich, dass in den meisten auf Basta<sup>®</sup>-haltigem Selektionsmedium regenerierenden Kalli auch tatsächlich eine Rekombination der transformierten DNA stattgefunden hat. So zeigten die Linien TS71-1, TS79-1, TS79-4 und TS79-5 in mehr als der Hälfte aller untersuchten Kalli das erst nach erfolgreicher Rekombination zustande kommende PCR-Amplifikat 35S/*bar* (s. Tabelle 7). Die Ergebnisse der PCR-Analysen decken sich mit den Beobachtungen der Regenerationsdaten (s. Tabelle 6). Die Linie TS79-1 zeigte nicht nur die meisten Regenerate (7,4%), sondern erwies sich sogar in den PCR-Analysen als die Linie, mit den meisten Integrationsereignissen (86%). Und auch die Linien TS79-4 und TS79-5 zeigten in den PCR-Analysen eine hohe Anzahl an positiven Ergebnissen (2,0% und 1,2% Regenerate bzw. 70% und 54% positiv). Bei den vier Linien, die in der zweiten Versuchsdurchführung hitzebehandelt wurden, konnte nur eine geringe Anzahl an regenerierenden Kalli getestet werden. Das sind die Linien TS71-1, TS71-3, TS85-1 und TS85-2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen Linien, die nach Hitzebehandlung auf neuem Selektionsmedium regenerierten, erfolgreich rekombinierte DNA mittels PCR nachgewiesen werden konnte.

### 3.5.4 Sequenzanalysen des modifizierten Integrationskonstrukts

Um nachweisen zu können, dass es sich bei der nach der Hitzebehandlung durch die Primer 329/459 entstehenden PCR-Bande (s. Abbildung 27B) tatsächlich um das erwartete Produkt (35S/*bar*) handelt, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Banden aus dem Agarosegel eluiert und sequenziert. Tatsächlich bewiesen die Sequenzanalysen, dass es sich hierbei um

die durch die FLP-Rekombinase neu arrangierte DNA, nämlich den Übergang von 35S-Promotor in das *bar*-Gen und der dazwischen liegenden *FRT-site*, handelt (s. Abbildung 28).

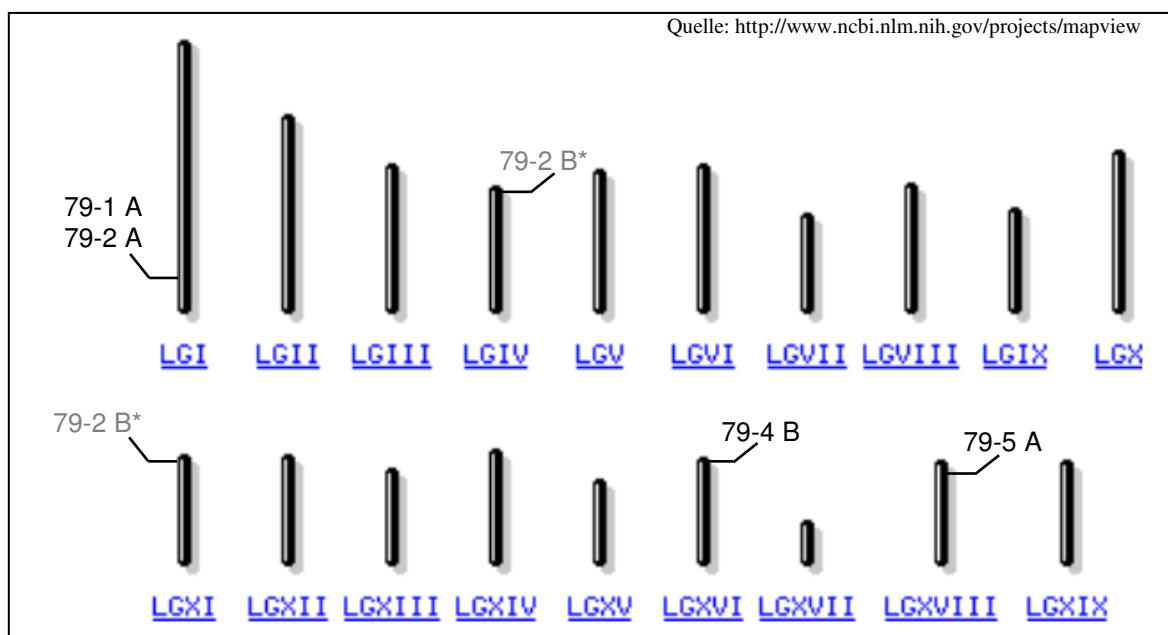
TS79-1	...TTGGAGAGGACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCATGGGCCAG...
TS79-4	...TTGGAGAGGACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCATGGGCCAG...
TS79-5	...TTGGAGAGGACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCATGGGCCAG...
Legende: 35S-Promotor FRT-site bar-Gen	

**Abbildung 28: Sequenzvergleich der PCR-Produkte unterschiedlicher hitzebehandelter Zitterpappellinien.** Das *bar*-Gen ist durch Rekombination unter Kontrolle des 35S-Promotors gelangt. Dazwischen liegt die *FRT-site*.

Auch hier konnten nur die Linien TS79-1, -4 und -5, die in der ersten Versuchsdurchführung hitzebehandelt wurden und Kalli regenerierten, untersucht werden. Bei diesen Linien ist es nachweislich gelungen durch Aktivierung des FLP-Rekombinationssystems zielgerichtet das Transgen (*bar*-Gen) in einen zuvor definierten Locus im Zitterpappelgenom (*FRT-site* des pbTSin1 Vektors) zu integrieren.

### 3.5.5 Analyse der genomischen Insertionsorte bei Zitterpappel

Um festzustellen in welchen genomischen Bereichen der Zitterpappel die T-DNAs der Integrationsvektoren inserierten, wurden *Inverse PCR*-Analysen durchgeführt (s. 2.2.1.3.6).



**Abbildung 29: Schematische Darstellung der 19 Chromosomen von *Populus trichocarpa* mit den identifizierten Insertionsorten der Vektoren pbTSin1 (A) und pbTSin2 (B).** 79-2 B\* = der Vektor pbTSin2 ist in dieser Linie entweder auf dem IV- oder XI-Chromosom inseriert. LG: *linkage group*

In die Übersicht des *Populus trichocarpa* Genoms sind die mittels *Inverse PCR* analysierten Insertionsorte eingezeichnet (s. Abbildung 29). So befindet sich die transferierte DNA-Sequenz des Vektors pbTSin1 bei den Linien TS79-1 und TS79-2 zufällig fast an der gleichen Stelle des Chromosoms I, nämlich bei TS79-1 an Position 28.914.934 bp bzw. an Position 28.914.695 bp bei TS79-2. Bei einer Gesamtlänge des Chromosoms I von 35.571.569 bp sind die Insertionsorte demnach im hinteren Achtel des Chromosoms lokalisiert (vgl. auch Tabelle 8). Der Insertionslocus des Vektors pbTSin2 kann bei der Linie TS79-2 nicht exakt bestimmt werden. Die Sequenzanalysen ergaben, dass die T-DNAs in einen homologen Bereich zweier Chromosomen des Pappelgenoms (Tuskan et al., 2006) inseriert sind. So lässt sich nicht genau bestimmen, ob die DNA auf dem Chromosom IV in Position 2,34 Mb oder auf Chromosom XI in Position 2,77 Mb lokalisiert ist. In jedem Fall sitzen die beiden transferierten T-DNAs bei der Linie TS79-2 auf unterschiedlichen Chromosomen: pbTSin1 auf Chromosom I und pbTSin2 auf Chromosom IV oder XI. Bei den Linien TS79-4 konnten bislang nur der Insertionsort des Vektors pbTSin2 und bei den Linien TS79-4 und -5 nur der Insertionsort des Integrationsvektors pbTSin1 bestimmt werden.

Eine Übersicht über die Sequenzanalysen und Insertionsorte ist in Tabelle 8 zusammengestellt.

**Tabelle 8: Übersicht bekannter Insertionsbereiche der Integrationsvektoren im Pappelgenom.**

Linie	pbTSin2	pbTSin1
79-1		<u>LG_I</u> : 28.914.432 - 28.914.934 bp Gesamtlänge I: 36 Mb
79-2	<u>LG_IV</u> : 2.337.744 - 2.337.947 bp Gesamtlänge IV: 17 Mb oder <u>LG_XI</u> : 2.766.039 - 2.766.232 bp Gesamtlänge XI: 15 Mb	<u>LG_I</u> : 28.914.550 - 28.914.695 bp
79-4	<u>LG_XVI</u> : 1.543.929 - 1.544.034 bp Gesamtlänge XVI: 14 Mb	
79-5		<u>LG_XVIII</u> : 2.938.217 - 2.938.327 bp Gesamtlänge XVIII: 13 Mb

## 4 Diskussion

Um Markergene, die nach der Selektion transgener Pflanzen nicht mehr benötigt werden, wieder zu entfernen, konnte im Rahmen dieser Arbeit das FLP/*FRT*-Rekombinationssystem erstmals in Weizen und Zitterpappel erfolgreich angewendet werden. Darüber hinaus wurde auch eine zielgerichtete Integration eines Transgens mit diesem System in Zitterpappel durchgeführt, was einen entscheidenden Fortschritt für die damit verbundene Transgenstabilität und –expression ermöglicht.

Dazu wurde zunächst in transienten Expressionsstudien gezeigt, dass sich der hitzeinduzierbare Promotor aus der Sojabohne (Gmhsp17.5-E) für die Kontrolle der FLPase sowohl in Weizen als auch in Zitterpappel eignet. Im Falle der Exzision gelang es den Selektionsmarker *nptII* in Weizen und Zitterpappel zu eliminieren und im Zuge dieser Rekombination das promotorlose GUS-Gen zu einer funktionellen Genkassette zu arrangieren. Des Weiteren konnte in Zitterpappel ein promotorloses *bar*-Gen in einen definierten von *FRT-sites* flankierten DNA-Bereich mit Hilfe des Rekombinationssystems zielgerichtet integriert werden.

Diese Arbeit stellt die ersten erfolgreichen Exzisions- und Integrationsversuche mit Hilfe des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems in Weizen und Zitterpappel dar.

### 4.1 Promotorstudien

Zur Gewährleistung einer genspezifischen und zeitlich definierten Transkription der FLPase ist es notwendig, diese durch äußere Faktoren gezielt zu steuern. Dies könnte durch die transiente Expression der Rekombinase oder durch den Einsatz induzierbarer Promotoren gewährleistet werden. Hierfür könnten Systeme verwendet werden, die durch verschiedene biotische oder abiotische Faktoren aktivierbar sind (Zhang *et al.*, 2003). Die zeitweilige Expression der FLPase kann durch eine weitere transiente Transformation von *FRT-sites* tragenden Pflanzen oder unter Verwendung viraler Expressionssysteme erreicht werden. So gelang es Kopertekhs *et al.* (2004) *lox*-haltige Tabakpflanzen mit einem die Cre-Rekombinase tragenden Kartoffelvirus zu infizieren und so die Exzision einer Zielsequenz aus dem Tabakgenom zu vermitteln. Aber auch verschiedene hitzeinduzierbare Promotoren sind bereits erfolgreich zur Steuerung der Rekombinasen in Arabidopsis (Cre: Hoff *et al.*, 2001, FLP: Kilby *et al.*, 2000), in Tabak (FLP: Kilby *et al.*, 1995) und in Mais (Cre: Zhang *et al.*, 2003) eingesetzt worden. Zur gezielten Induktion von Rekombinationssystemen werden auch

erfolgreich chemisch induzierbare Promotoren eingesetzt, die einerseits durch Hormone, wie etwa Östrogen (Zuo *et al.*, 2001) oder andererseits durch Glukokortikoide, wie Dexamethason (Joubes *et al.*, 2004) gesteuert werden.

Alle induzierbaren Promotoren müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllen: Zum einen dürfen sie keine oder eine nur sehr geringe Hintergrundaktivität aufweisen; zum anderen müssen sie eine ausreichend starke Expression des dahinterliegenden Gens bewirken. Für den aus der Sojabohne stammenden Hitzeschockpromotors Gmhsp17.5-E war bereits aus Vorversuchen bekannt, dass er sich für die Verwendung in Zitterpappel eignet (Fladung *et al.*, 2005). In einem ersten Versuchsansatz sollten nun dieser sowie ein weiterer hitze- (Hsp82B) und ein kälteinduzierbarer Promotor (wcs120) in transienten Expressionsstudien auf deren Induzierbarkeit in Weizen überprüft werden (s. 3.1). Dazu wurden die Promotoren vor ein GUS-Gen kloniert und transiente Transformationen durchgeführt. Anschließend wurde durch Hitze- bzw. Kälteinduktion bei unterschiedlichen Temperaturen und zu verschiedenen Zeitintervallen versucht die Promotoren zu aktivieren (s. 3.1.2). Die Auswertung der transienten GUS-Expression zeigte in Weizenembryonen eine deutliche Aktivierung des Promotors Gmhsp17.5-E, aber keine Aktivität der beiden anderen Promotoren. Dies ist unverständlich, da sowohl der hitzeinduzierbare Promotor Hsp82B (Reis) als auch der kälteinduzierbare Promotor wcs120 (Weizen) aus monokotyledonen Pflanzen bzw. aus dem Weizen selbst stammen. Selbst die Sequenzanalysen der amplifizierten Promotorbereiche erbrachten keine vorhandenen Deletionen im Vergleich zu den publizierten Promotorsequenzen (s. Anhang). Lediglich der Promotor Hsp82B wies einzelne Punktmutationen auf: T667G, T804C und C905T, die jedoch alle außerhalb der für die Hitzeaktivierung benötigten Motive des Promotors liegen (Czarnecka *et al.*, 1989). Ein Fehler bei der biolistischen Transformation kann ausgeschlossen werden, da das ebenfalls mittransformierte Kontrollkonstrukt, ein konstitutiv exprimiertes *gfp*-Reporter gen, detektierbare Signale zeigte.

Arbeiten von Ganeshan *et al.* (2008) mit dem kälteinduzierbaren Promotor wcs120 zeigen, dass es bereits zwei Tage nach der Kältebehandlung zu einer signifikanten Erhöhung des Transkriptionslevels im Blattgewebe unterschiedlicher Weizensorten kommt (Norstar und Manitou, jeweils Sommer- und Wintersorten). Ouellet *et al.* (1998) konnten zeigen, dass der Promotor wcs120 in Mono- und in Dikotyledonen aktivierbar ist, z. B. Raps (*Brassica napus*), Luzerne (*Medicago sativa*), Paprika (*Capsicum annuum*), Gurken (*Cucumis sativus*) und Tomaten (*Lycopersicon esculentum*). Die Aktivierung des Promotors wcs120 wurde bei 4°C-

10°C über eine Woche, mit einer Lichtdauer von 12 Stunden pro Tag an jungen Pflanzen durchgeführt. Neben dem *wcs120* wurden ebenso auch andere kälteinduzierbare Promotoren (*wcs410*, *wcs14*) der COR-Familie (COR: Coronatin) induziert, deren Aktivität nicht ausschließlich durch die anfängliche Kälteadaptation gesteuert wurde. So hängt die Beeinflussung nachgeschalteter Gene neben einer zusätzlichen Regulation durch den an die Kälte angepassten veränderten Pflanzenstoffwechsel (Chinnusamy *et al.*, 2007), auch vom Entwicklungsstadium der Pflanze ab (Fowler *et al.*, 2001). Die Lichtmenge (Franklin und Whitelam, 2007) und tagesrhythmische Einflüsse wie die innere Uhr der Pflanze nahmen ebenfalls Einfluss auf die Aktivierbarkeit solcher Kälteadaptatoren, was in Arabidopsis gezeigt werden konnte (Michael *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde beschrieben, dass durch eine fortschreitende Kälteadaptation Gene, v. a. welche eine Signal- oder regulatorischen Funktionen ausüben, wie Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen, Ubiquitinligasen und calciumbindende Proteine unterschiedlich beeinflusst werden (Vazquez-Tello *et al.*, 1998; Monroy *et al.*, 2007). Vazquez-Tello *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass die Expression von *wcs120* in Weizen offensichtlich durch De- bzw. Phosphorylierungen vermittelt von Proteinphosphatasen negativ beeinflusst wird. So gelang es durch Zugabe von einem starken Phosphatase Inhibitor (DSP, Okadainsäurederivat), die Expression von *wcs120* positiv zu beeinflussen. Da die transienten Expressionstudien in der vorliegenden Arbeit in Abwesenheit von Licht und in unreife Weizenembryonen und nicht in Weizenpflanzen durchgeführt wurden, könnten diese Faktoren mögliche Ursachen für die ausgebliebene Aktivierung des kälteinduzierbaren Promotors *wcs120* sein.

Für die Aktivierung des Promotors Hsp82B aus Reis (Erkine *et al.*, 1999) wurde dieser in der vorliegenden Arbeit bei 37°C - 42°C für 3 - 24 Stunden hitzebehandelt. Van Breusegem *et al.* (1994) bestätigt für den Hsp82B Promotor eine ausschließliche Hitzeaktivierung in Reis, im Gegensatz zu andern der gleichen Familie zugehörigen Hitzepromotoren, z. B. Hsp70, der auch durch andere Stressfaktoren, die zu Proteindenaturierung führen wie z. B. Salz- oder Alkoholstress, aktiviert werden können. Auch zeigten Van Breusegem und Mitarbeiter, dass der Promotor Hsp82B bereits nach zwei Stunden bei 42°C in Reis sein höchstes Transkriptionsniveau erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Promotor Hsp82B aus Reis mittels PCR amplifiziert und in dem Expressionskonstrukt pGusi-AM transient in unreife Weizenembryonen eingebracht. Selbst nach einer Hitzebehandlung von 42°C über 24 Stunden konnte keine Transkription des GUS-Reportergens beobachtet werden (s. 3.1). Eine mögliche Ursache dafür können fehlende Enhancerbereiche *upstream* des Promotorbereiches



im Weizengenom oder fehlende Transkriptionsfaktoren sein, ohne die keine ausreichende Aktivierung der Promotorregion stattfinden kann. Gross *et al.* (1993) konnten für den hitzeinduzierbaren Promotor Hsp82 aus Hefe zeigen, dass durch Deletion eines 750 bp *upstream* des eigentlichen Promotors liegenden Motivs (HSE1), welches für die Bindung des Hitzeschockfaktors (HSF) notwendig ist, nur noch eine geringere Aktivierung erreicht werden kann. Außerdem ist HSE1 für die korrekte Chromatinstruktur notwendig, um durch die räumliche Anordnung zweier Bereiche, einen innerhalb des Kernpromotors (TATA-Box) und einen 340 bp *upstream* des Promotors, eine Bindung der HSFs zu gewährleisten. Ist diese sterische Anordnung nicht gegeben, blockiert ein Repressor die *cis*-Aktivierung des Hsp82 Promotors aus Hefe (Lee und Gross, 1993).

Der zweite eingesetzte hitzeinduzierbare Promotor aus Sojabohne Gmhsp17.5-E (Czarnecka *et al.*, 1985, 1989, 1990, 1992) hatte bei Zitterpappel in Vorversuchen bereits eine Hitzeinduzierbarkeit gezeigt (Fladung *et al.*, 2004). Und auch in den transienten Expressionsstudien in Weizenembryonen zeigte dieser Promotor eine reproduzierbare Hitzeaktivierung. Tatsächlich wird er in vielen Forschungsarbeiten in verschiedenen Organismen als zuverlässiger, gut induzierbarer Promotor verwendet: Tabak (Ainley und Key, 1990; Prandl und Schoffl, 1996), Arabidopsis (Kilby *et al.*, 1995), Mais (Lyznik *et al.*, 1995), Physcomitrella (Saidi *et al.*, 2005). Ainley und Key (1990) zeigten eine etwa 80mal höhere Effizienz (pro Zeiteinheit) des Gmhsp17.5-E Promotors als der CaMV 35S-Promotor in einem transienten GUS-Expressionsansatz in Tabakprotoplasten. Die Hitzeaktivierung der Zitterpappelgewebekulturen erfolgte in dieser Arbeit für 3 Stunden bei 42°C, bei adulten Weizenpflanzen hingegen nur bei 39°C über einen Zeitraum von 6 Stunden hinweg. Diese Veränderung der Versuchsparameter, weg von den in transienten Tests ermittelten optimalen Versuchsparametern von 42°C über 24 Stunden, war notwendig, da freistehende Weizenpflanzen eine Hitzeperiode von mehr als 3 Stunden bei 42°C nicht überstanden. Auch der hitzebedingte Wasserstress bei Pflanzen war Anlass, die Temperatur mit welcher der Weizen in dieser Arbeit behandelt wurde zu verringern. Im Gegensatz dazu, befanden sich die Zitterpappel *in vitro* Kulturen in geschlossenen Gefäßen, in denen sie den Hitzestress offensichtlich besser widerstehen konnten. Die Hitzeinduktion wird so auch in anderen Arbeitsgruppen durchgeführt, meist bei 42°C für 2 - 3 Stunden (Neumann *et al.*, 1997).

Ein Problem bei der Verwendung von hitzeinduzierbaren Promotoren besteht darin, dass durch die Hitzebehandlung der Pflanzen nicht nur der gewünschte Effekt der

Promotoraktivierung erfolgt, sondern es auch zur Aktivierung einer Reihe von endogenen Prozessen kommt, wie z. B. der sogenannten SOS-Antwort (Shinagawa *et al.*, 1988; Maul und Sutton, 2005). Unter den erhöhten Temperaturen während der Hitzebehandlung ist eine korrekte Faltung der Proteine erschwert, da die hierfür benötigten Chaperone bei diesen Temperaturen nicht effizient arbeiten. Erst unter den Standardanzuchtbedingungen von 25°C ist eine native Faltung in ausreichendem Maße möglich, die zur Funktionalität der Proteine führt. Direkt nach dem Hitzeschock könnte somit nur eine verringerte Anzahl nativer Reporterproteine in der Zelle vorliegen und eine sofortige Auswertung würde zu falschen Ergebnissen führen. Durch die transienten Expressionsstudien konnte in Weizen geklärt werden, dass nach einer Regenerationsphase von einem Tag ausreichende Mengen der Reporterproteine GFP und GUS in der Zelle akkumulierten. Daher wurden auch bei der Detektion stabil transformierten Weizens und Zitterpappel die Blätter erst einen Tag nach dem Hitzeschock der GUS-Färbung unterzogen.

### **4.2 Exzision des Markergens *nptII***

Die Eliminierung von Markergenen stellt einen wichtigen Punkt bei der Erhöhung der Biosicherheit transgener Pflanzen dar, da häufig Antibiotika-Resistenzgene zur Selektion von transgenen Pflanzen eingesetzt werden. Die seit Oktober 2002 gültige EU-Richtlinie des Europäischen Parlamentes und des Rates 2001/18/EG verlangt sogar eine „schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in GVO“ (Gentechnisch veränderten Organismen). Auch deshalb ist das nachträgliche Entfernen solcher Markergene von großem Interesse.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Eliminierung von Markergenen unter Verwendung des FLP/FRT-Rekombinationssystems sowohl in Weizen, als auch in Zitterpappel möglich ist. Als Beweis diente das Reporter gen GUS, welches bei erfolgreicher Exzision des von *FRT-sites* flankierten DNA-Abschnitts (*nptII*, *Gmhsp*, FLP, T35S) transkribiert und histochemisch nachgewiesen wurde. Bei Weizen wie auch bei Zitterpappel konnte nach der Hitzebehandlung die GUS-Expression detektiert werden (s. 3.4.2). Auch wurde bei Weizen in transienten Expressionsstudien innerhalb der getesteten Parameter und durch Transkriptionsanalyse der FLPase eine ausschließliche Hitzeaktivierung des *Gmhsp17.5-E* Promotors nachgewiesen. So zeigte sich erst nach der Hitzebehandlung die vermutliche prä- (900 bp) und die gespleißte mRNA (700 bp) der FLPase, wohingegen vor

der Hitzebehandlung keinerlei Transkript mit einer FLP-Sonde detektiert werden konnte (s. 3.4.5). Außerdem gelang es die durch die Rekombination modifizierte Genkassette mittels PCR im Genom nachzuweisen (s. 3.4.3). Sequenzanalysen bestätigten die Exzision und somit den erwarteten Übergang des 35S-Promotors in das GUS-Gen (s. 3.4.4). Die dazwischenliegende *FRT-site* ist in sämtlichen untersuchten Zitterpappellinien erhalten geblieben, im Weizen hingegen findet sich bei einer Linie zwischen Promotor und GUS-Gen eine DNA-Sequenz, die keinerlei Homologien zu bekannten DNA-Sequenzen in einer BLAST-Recherche aufweist, die *FRT-site* war nicht nachweisbar. Als weiterer molekularer Beweis der Exzision konnte auch mit Southern Blot Analysen die durch Rekombination verkürzte DNA-Sequenz detektiert werden (s. 3.4.6).

Da jedoch bei Weizen die Exzisionsereignisse nicht mittels Southern Blot Analysen nachgewiesen werden konnten, wurde die Transkription der FLP-mRNA mit RT-PCR Analysen näher charakterisiert (s. 3.4.5). Da es sich bei der RT-PCR um keine quantitative Analyse handelt, lässt sich zwar beweisen, dass nach dem Hitzeschock die FLPase transkribiert wird, nicht aber in welchem Umfang. Ein möglicher Grund für die geringe Exzisionsfrequenz bei Weizen könnte der unterschiedliche Codon-Gebrauch (*codon usage*) zwischen Hefe, aus der die FLP-Rekombinase stammt, und den höheren Pflanzen sein, zumal sich hier Weizen als Vertreter der Monokotylen und Zitterpappel als dikotyle Pflanze zusätzlich unterscheiden. Die bevorzugte Verwendung der verschiedenen Organismen von bestimmten Codons (Karlin *et al.*, 1998) des degenerierten Codes beeinflusst die Konzentration der tRNA. Kommen viele selten verwendete Codontripletts vor, kann dies die Proteinbiosynthese verlangsamen und so die Konzentration des kodierten Proteins wesentlich beeinflussen (Hoekema *et al.*, 1987). Im Vergleich der unterschiedlichen Triplet-Kodierung zwischen den verwendeten Organismen zeigt sich, dass die Hefe den geringsten GC-Gebrauch im ersten Nukleotid des Tripletts von 39,7% aufweist (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>), wovon die Zitterpappel nur gering abweicht (43,8%). Der Weizen hingegen hat einen viel höheren GC-Gebrauch (53,5%). Möglicherweise könnte diese Abweichung des Codon-Gebrauchs bei Weizen im Vergleich zur Hefe eine geringere Translation der FLP-mRNA erklären und somit eine geringere Effizienz der stattgefundenen Exzisionsereignisse zur Folge haben.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Codon-Optimierung von bakteriellen Genen für deren Verwendung im Hefegenom eine deutliche Steigerung der Substratumsetzung durch die

gebildeten synthetischen Enzyme bewirken kann. Wiedemann und Boles (2008) veränderten die Triplet-Kodierung des bakteriellen L-Arabinose-Gens in eine mehr der Hefe ähnelnde. Durch die damit verbundene Steigerung des Umsatzes der verwendeten Zucker zu Alkohol konnte eine 2,5-fache Zunahme des Endprodukts erzielt werden. Auch ermöglichte erst die Codon-Optimierung eines Gens, welches die Untereinheit B des Cholera-Toxins kodiert, dieses Protein in transgenen Reispflanzen zu exprimieren (Oszvald *et al.*, 2008). In der Arbeitsgruppe von Shao und Bock (2008) konnte durch Codon-Optimierung des *Gussia-Luziferase*-Gens ein sensitives Reportersystem in *Chlamydomonas* für die Genexpression aufgebaut werden. Bereits 1992 konnten Sutton *et al.* durch eine Erhöhung des GC-Gehalts des nativen *cryIIIA*-Gens aus *Bacillus thuringiensis* von 36% auf 49% die Stabilität des RNA-Transkripts in transgenem Tabak steigern. Auch Adang *et al.* (1993) erreichten durch die Codon-Optimierung des *CryIIIA*-Gens in Karotten (Dikotyle) und Kartoffel (Monokotyle) eine gesteigerte Insektenresistenz. Wohlleben *et al.* (1988) konnten durch den Austausch des Startcodons von GTG zu ATG in dem *pat*-Resistenzgen aus *Streptomyces viridochromogenes* erstmals erfolgreich transgene Tabakpflanzen gegen Basta<sup>®</sup> generieren.

Jedoch führen solche Verfahren für den Gebrauch von heterologen Genen, nicht immer zu gesteigerter Translation. So zeigte z. B. eine native und eine Codon-optimierte Variante eines Malaria Proteins keine Unterschiede in ihrer Expression in embryogenen Weizenzellen (Tsuboi *et al.*, 2008). Dass eine Codon-Optimierung der FLPase jedoch durchaus eine Steigerung der Expression zur Folge haben kann, zeigten Song und Niederweis (2007). Sie erhöhten den GC-Gehalt der FLPase von 39% auf 61% und konnten so, mit dieser synthetischen FLP<sub>m</sub>-Rekombinase eine um 100-fach höhere Rate an Exzisionsereignissen in *Mycobacterium smegmatis* beobachten. Und auch in *Mycobacterium bovis* konnten sie mit FLP<sub>m</sub> eine 40%-ige Exzision des von *FRT-sites* flankierten Hygromycin-Resistenzgens feststellen. Eine weitere aktuelle Arbeit berichtet ebenfalls von einer erfolgreichen Codon-Optimierung der FLPase für die Verwendung in Bakterien mit GC-reichem Genom (Fedoryshyn *et al.*, 2008). So konnte mit dieser modifizierten FLPase (GC-Gehalt: 61%) das Rekombinationssystem in *Streptomyces coelicolor*, *S. lividans* und *Saccharotrix espanaensis* erfolgreich zur Exzision von Apramycin eingesetzt werden, und zwar mit einer Exzisionsrate von 40%. Diese Arbeiten demonstrieren, dass durch die Veränderung des genetischen Codes generell Steigerungen in der Effizienz und Translation von Proteinen möglich sind und stellen auch einen vielversprechenden Ansatz für die Effizienzsteigerung der FLPase in Weizen dar. So konnte mittlerweile in Mais (GC-Gehalt: 55%) gezeigt werden, dass eine codon-optimierte

FLPase, die einen GC-Gehalt von 54% besitzt, eine fast 100%-ige Transkriptionssteigerung gegenüber der nativen FLPase aufweist (pers. Mitteilung, D. Becker, Universität Hamburg). Da Mais und Weizen einen sehr ähnlichen Codon-Gebrauch besitzen, sollten zukünftige Arbeiten untersuchen, ob sich auch in Weizen durch diese gesteigerten FLP-Transkriptionsraten eine höhere Exzisionrate erreichen lässt. Ein weiterer Ansatzpunkt für die Effizienzsteigerung der FLPase sind neben der Codon-Optimierung die Bindungsaffinität zwischen der Rekombinase und der DNA (Ringrose *et al.*, 1998) und die Thermolabilität der Rekombinase selbst. So beschreiben Buchholz *et al.* (1996), dass das Temperaturoptimum der aus Hefe stammenden FLPase bei 30°C liegt und ab 39°C keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Um zu gewährleisten, dass die FLPase auch bei 37°C ausreichend stabil und enzymatisch aktiv bleibt, wurde die kodierende Sequenz von FLP durch gezielte Mutationen verändert (Buchholz *et al.*, 1998). Diese veränderte „FLPe“ hat den Vorteil z. B. auch in Säugetieren, welche permanent eine Körpertemperatur von 37°C haben, zuverlässig angewandt werden zu können (Kanki *et al.*, 2006).

Ein weiterer Grund dafür, dass es nicht in allen Linien zu einer 100%-igen Eliminierung des Markergens *nptII* gekommen ist, könnte sein, dass es bei Mehrfachintegrationen der Genkassette in einer Zelle zu keiner vollständigen Rekombination aller integrierten Genkassetten gekommen ist. So ist zwar nach der Hitzebehandlung die erwartete Bande der modifizierten DNA (2,8 kb) nachzuweisen, dennoch bleibt die ursprüngliche Bande (6 kb) sichtbar. Bei solchen Mehrfachintegrationen ist zusätzlich ein Silencing-Effekt denkbar. Da wie bereits erwähnt der eingesetzte Gm<sub>hsp17.5</sub>-E Promotor eine hohe Aktivität aufweist, könnte insbesondere bei Zellen mit mehreren integrierten Kopien die Überexpression der Genkassetten zu einem Gene Silencing führen. Da bei der Isolierung der genomischen DNA stets Zellkerne mehrerer Pflanzenzellen zusammenkommen, ist es durchaus denkbar, dass so DNA von nicht rekombinierten und erfolgreich rekombinierten Zellen zusammentrifft. Grundsätzlich ist jedoch nach der Exzision durch die FLPase auch wieder eine Rückreaktion, also die Integration des von *FRT-sites* flankierten DNA-Abschnitts möglich (Chen *et al.*, 2003; Gidoni *et al.*, 2008). Allerdings ist diese Rückreaktion thermodynamisch benachteiligt (Baer und Bode, 2001). Nichts desto trotz könnte eine nicht rekombinierte DNA-Bande im Southern Blot auch bedeuten, dass eine Exzision zwar stattgefunden hat, im Rahmen der Rekombination aber der ausgeschnittene DNA-Abschnitt wieder in das Genom illegitim reintegriert ist (Golic und Lindquist, 1989; Ow und Srivastava, 2003).

Bereits die Studien von Kerbach *et al.* (2005) in Mais stellten eine geringere Effizienz des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems als die des Cre/*loxP*-Systems fest. In diesen Arbeiten wurden die Rekombinationsereignisse durch Kreuzungen hervorgerufen, in denen die eine Pflanze das Cre- bzw FLP-Gen trug, die andere jeweils die Erkennungssequenzen *loxP* bzw. *FRT*. Die Rekombination fand während der Kreuzung der Maislinien, also in einem sehr frühen Stadium statt, während in der vorliegenden Arbeit durch die Hitzebehandlung der adulten Pflanzen eine Rekombination in somatischen Pflanzenzellen ausgelöst wurde. Das mag eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, dass nicht in allen Pflanzenzellen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat, und deshalb in den Southern Blot Analysen auch die ursprünglich übertragene T-DNA Bande (6 kb) noch sichtbar ist, anders als die von Kerbach *et al.* (2005) beobachtete 100%-ige Exzision in Mais.

Einen Ausweg aus der Problematik der reversiblen Reaktion von Cre- und FLP-Rekombinase bietet ein anderes irreversibles Rekombinationssystem, das Integrase-*att* System aus dem *Streptomyces* Bakteriophagen phiC31 (Thorpe und Smith, 1998). Dieses System bietet den Vorteil, dass die verwendeten Erkennungssequenzen *attB* (*attachment sites* aus dem Bakterium) und *attP* (*att* aus dem Phagen) nach erfolgter Rekombination nicht mehr für die Integrase phiC31 verfügbar sind. Ohne die Anwesenheit von zusätzlichen Cofaktoren ist für die Integrase keine Rückreaktion möglich (Rubtsova *et al.*, 2008). Anwendung findet dieses Rekombinationssystem z. B. in Tabak (Ow, 2002), zur stabilen Plastidtransformation (Lutz *et al.*, 2004) oder der irreversiblen Eliminierung von Markergenen (Kittiwongwattana *et al.*, 2007).

Trotz einer nicht immer 100%-igen Exzision zeigt die sequenz-spezifische Eliminierung von Markergenen im Vergleich zu anderen Methoden, wie der Transposition, entscheidende Vorteile. So konnte auch im Rahmen dieser Arbeit die Genauigkeit der Exzision auf DNA-Ebene nachgewiesen werden, was bei transponierbaren Elementen nicht immer der Fall ist (Langer *et al.*, 2007). Außerdem ist die in dieser Arbeit beobachtete Frequenz der Exzisionsereignisse der sequenz-spezifischen Reaktion höher als die durch die Transposons vermittelten. Hier konnten bislang nur Resultate von 5,6% bei Mais (Levy und Walbot, 1990) und weniger als 10% bei Tomate (Belzile *et al.*, 1989) erzielt werden. Die Exzision des Selektionsmarkers, der innerhalb der Transposonelemente liegt, erfolgt durch die Aktivierung der transponierenden Elemente. Ebinuma *et al.* (1997) zeigt durch den Einbau des Isopentenyltransferase-Gens (*ipt*) in das *Ac*-Element die Exzision des Selektionsmarkers *ipt* durch Transposition in Tabak und Pappelhybriden. Nach erfolgreicher Exzision wurde auf

hormonfreiem Medium die Selektion durchgeführt. Pflanzen, die Sprosse bildeten, hatten das *ipt*-Gen exzisiert. Die hierbei beobachtete Exzisionsfrequenz betrug nur 0,03%.

### 4.3 Integration des *bar*-Gens

Bei nahezu allen pflanzlichen Transformationsmethoden erfolgt die Integration der Transgene rein zufällig irgendwo im Genom. Eine Methode zur zielgerichteten Integration von Transgenen in das Genom wäre von enormer Bedeutung, da so Stabilität und Expression des Transgens sichergestellt werden können. Des Weiteren ermöglicht eine zielgerichtete Integration unterschiedliche Transgene immer wieder an derselben Stelle des Genoms zu integrieren. Dadurch könnten unerwünschte Nebeneffekte wie z. B. das Inserieren des Transgens in wichtige Genabschnitte oder in wenig transkriptionsaktive Bereiche der Pflanze vermieden werden. Störende Positionseffekte durch zufällige Integration könnten so ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine zielgerichtete Integration eines Transgens mit Hilfe des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems in Zitterpappel gezeigt werden. Dazu wurden zwei Konstrukte mit der Agrobakterien-vermittelten Transformationsmethode ko-transformiert, eines mit der FLPase, das andere mit dem zu inserierenden promotorlosen *bar*-Gen. Die T-DNAs beider Konstrukte inserierten jeweils unabhängig voneinander an unterschiedlichen Positionen im Genom. Die doppeltransgenen Zitterpappellinien wurden nach Hitzebehandlung auf Basta<sup>®</sup>-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Es konnte insgesamt in sieben von acht untersuchten Zitterpappellinien eine Integration des *bar*-Gens an den zuvor definierten Genomlocus nachgewiesen werden (s. 3.5.3). Diese nach der Rekombination festgestellten Integrationsereignisse bezogen auf die Gesamtmenge der ausgestrichenen Pflanzenstücke (s. 3.5.2) traten mit einer Rate zwischen 0,1% und 6,4% auf, wobei die meisten Integrationsereignisse mit einer Rate von 0,2% - 1,4% beobachtet wurden. Diese Integrationsereignisse wurden zudem durch PCR-Amplifikation der 35S/*bar*-DNA und anschließender Sequenzanalyse bestätigt (s. 3.5.4).

In den PCR-Analysen wurde in einigen Regeneraten neben der erwarteten 35S/*bar*-Bande teils auch der eigentlich nicht mehr vorhandene 35S/*nptII* DNA-Abschnitt amplifiziert. Dies zeigt erneut, dass die Exzision nicht vollständig zu 100% stattfindet. Da für die Integration Pflanzen gewählt wurden, bei denen die Genkassetten lediglich ein einziges Mal ins Genom

integriert sind, ist hier eine Mehrfachintegration der Konstrukte auszuschließen. Eine Reintegration der FLP-tragenden Genkassette in den ehemaligen Locus des promotorlosen *bar*-Gens kann theoretisch nicht ausgeschlossen werden. Die Orientierung der *FRT-sites* und damit die Orientierung der womöglich reintegrierten DNA lässt ein PCR-Amplifikat mit den gewählten Primern nicht zu. Eine weitere mögliche Erklärung für die Amplifikation des *35S/nptII*-Bereichs ist auch, dass wie bereits erwähnt in der isolierten Gesamt-DNA eines regenerierten Kallus DNA stets viele unterschiedliche Zellkerne zusammentreffen. Deshalb kann es vorkommen, dass in einer DNA-Probe sowohl DNA aus Zellkernen mit erfolgreich stattgefundenener Rekombination (*35S/bar*) als auch DNA aus Zellkernen, bei denen es zu keiner erfolgreichen Rekombination gekommen ist (*35S/nptII*), zusammentreffen.

Die beobachtete durchschnittliche Integrationsrate, bezogen auf die Gesamtmenge der ausgestrichenen zerkleinerten Pflanzenstücke, beträgt 0,2% - 1,4%. Für eine Verwendung des Rekombinationssystems in Zitterpappel ist es daher von Nöten, auf eine hohe Anzahl von unabhängigen Zellaggregaten bzw. Pflanzenstücken zugreifen zu können. Nur wenn Ausgangsmaterial in ausreichender Menge bearbeitet werden kann, ist es bei diesen Integrationsraten wahrscheinlich, erfolgreiche Integrationsereignisse nachzuweisen. Die angegebene Integrationsrate ist jedoch nicht als echte „Frequenz“ (Ereignis pro Zelle) zu verstehen, sondern stets als „Rate“ bezogen auf die Gesamtanzahl der ausgestrichenen Pflanzenstücke. Da die zerkleinerten Pflanzenstücke auf festem Medium ausgestrichen wurden, war zu beobachten, dass nur sehr wenige der vielen äußerst kleinen Pflanzenstückchen regenerationsfähig waren. Dies mag durch die zum Vergleich der intakten Blattfläche großen Schnittbereiche und durch den damit ausgelösten Stress zusätzlich zum vorhandenen Selektionsstress verursacht sein. Viele der kleinen Pflanzenstückchen wurden bereits nach 1 - 2 Wochen nekrotisch und starben ab. Zusätzlich wird diese These gestützt, da sich viele der Regenerate nach dem Hitzeschock auf neuem Selektionsmedium häufig aus etwas größeren Pflanzenstücken bildeten. Diese Beobachtung legt nahe, dass die tatsächliche Rate der Integrationsereignisse wohl höher als die beobachtete Rate gelegen haben könnte.

Auch müssen bei der Betrachtung der Integrationsereignisse die molekularen Abläufe des Rekombinationsprozesses berücksichtigt werden. Die Integration durch die FLPase stellt die Rückreaktion der Exzision dar (Chen und Rice, 2003; Gidoni *et al.*, 2008). Das thermodynamische Gleichgewicht dieser Rekombination liegt auf der Seite der intrachromosomalen Exzision, was die interchromosomalen Integration benachteiligt (Bode *et*



*al.*, 2000). Einen vielversprechender Ansatz zur Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichts ist das Einbringen von Punktmutation in die Spacer-Region, bei der Cre-Rekombinase der *loxP*- bzw. *lox511-site* (Bethke und Sauer, 1997) und bei der FLPase der *FRT-sites* (Seibler und Bode, 1997). Diese heterospezifischen Erkennungssequenzen können nur mit gleichgearteten Erkennungssequenzen rekombinieren, was zwar einen Austausch (Integration) zweier Genkassetten, eine Exzision jedoch nur noch in geringem Maße zulassen sollte. Mit diesem modifizierten RMCE-Ansatz (Recombinase-mediated cassette exchange) konnte in Arabidopsis ein stabiler Genkassetten-Austausch etabliert werden (Louwerse *et al.*, 2007).

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Rekombinationsspezifität ist die Kombination des Cre/*loxP*- und FLP/*FRT*-Rekombinationssystems. Indem ein zu integrierendes Transgen von einer *loxP*-site auf der einen und von einer *FRT-site* auf der anderen Seite umgeben wird, kann dessen gezielte Integration durch ein Cre-/FLP-enthaltenden Expressionsvektor forciert und gleichzeitige Exzision verhindert werden (Lauth *et al.*, 2002; Djukanovic *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007).

Jedoch bietet die sequenz-spezifische Integration trotz der beschriebenen Schwierigkeiten gegenüber anderen Methoden entscheidende Vorteile. Die Methode der homologen Rekombination (Gisler *et al.*, 2002) nutzt zelleigene DNA-Reparaturmechanismen, die normalerweise dafür verwendet werden, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Diese Brüche können in Bereichen mit gleicher Sequenzabfolge erfolgen (homologe Rekombination) oder in Bereichen, die keine Sequenzhomologien aufweisen (nicht-homologe oder illegitime Rekombination). Bei Bakterien (Mosig, 1998) und somatischen Zellen niederer Eukaryonten wie der Hefe (Haber, 1998) stellt die homologe Rekombination den wichtigsten Rekombinationsweg dar. Bei Bakterien (Fitzgerald, 2007; Rodriguez *et al.*, 2008), niederen Eukaryonten, wie Hefe (Walther und Wendland, 2008) und höheren Eukaryoten, wie Drosophila (Maggert *et al.*, 2008) und sogar bei Mäusen (Botta *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008) wird die homologe Rekombination mittlerweile recht effizient für das gezielte Einbringen von Genen („gene targeting“) bzw. das An- und Ausschalten von Genen („knockout“) verwendet wird. Bei Pflanzen jedoch, mit der Ausnahme von *Physcomitrella* (Schaefer *et al.*, 1991; Schaefer und Zryd, 1997), beeinflusst die Sequenzhomologie anscheinend nicht ausschließlich die Transformationseffizienz. Selbst, wenn homologe Abschnitte existieren, erfolgt in den wenigsten Fällen die Insertion der T-DNA ins Genom am Ort der gewünschten Homologie, sondern ungerichtet und zufällig durch nicht-homologe Rekombination (Puchta, 2002). Verschiedene Versuche die Effizienz der homologen

Rekombination bei Pflanzen zu steigern, sind von mäßigem Erfolg. So brachte die Verlängerung des homologen zu rekombinierenden DNA-Abschnitts (Thykjaer *et al.*, 1997), die Verwendung von chimären Oligonukleotiden (Hohn und Puchta, 1999; Zhu *et al.*, 1999) oder aber auch ein provoziertes DNA-Doppelstrangbruch durch die transiente Expression der I-SceI Restriktionsendonuklease (Puchta, 1999a, b) keine nennenswerten höheren Rekombinationsraten. Neuere Ansätze, welche durch Inaktivierung der illegitimen Rekombination eine höhere Rate an stattfindenden homologen Rekombinationen erzwingen (Iizumi *et al.*, 2008) oder durch die Erzeugung von hyper-rekombinanten Arabidopsislinien (Hartung *et al.*, 2007; Kobbe *et al.*, 2008), bei denen der Verlust von RecQ zu vermehrten *Crossing Overs* führt, scheinen vielversprechender zu sein. In Reis werden homologe und sequenz-spezifische Rekombination miteinander kombiniert, um so punktmutierte selektionsmarkerfreie Reispflanzen zu generieren (Johzuka-Hisatomi *et al.*, 2008).

Jedoch konnten auch mit diesen verbesserten Verfahren der homologen Rekombination noch keine deutlichen Erfolge erzielt werden; deshalb stellt die homologe Rekombination bisher keine Alternative zur sequenz-spezifischen Rekombination dar.

Es gilt festzuhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gelungen ist, eine zielgerichtete Integration von Transgenen in Pflanzen mit einer so hohen Frequenz von 0,1% - 6,4% zu etablieren.

Da zwischen den doppeltransgenen Zitterpappellinien eine große Varianz bezüglich der Integrationsrate besteht, sollten durch Analyse der Insertionsorte der T-DNAs im Zitterpappelgenom eventuell Hinweise auf mögliche Ursachen dieser Varianz erhalten werden. Die Linie TS79-2 zeigte in keinem einzigen Fall einen regenerierenden Kallus. Mit Hilfe von *Inverse* PCR Analysen und Datenbankrecherchen (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Poptr1&advanced=1>) der erhaltenen DNA-Sequenzen konnten die Insertionsorte beider T-DNAs (pbTSin1 und pbTSin2) identifiziert werden. Die so erhaltenen Sequenzen des Zitterpappelgenoms wurden mit dem BLAST-Algorithmus mit dem Genom von *Populus trichocarpa* verglichen. Der Verwandtschaftsgrad beider Pappelarten bzw. -hybride lässt diesen Vergleich zu, jedoch gilt dies bei der Betrachtung der Homologien zu berücksichtigen. Eine Besonderheit in der Organisation der Pappelgenome ist die im Laufe der Evolution stattgefundene Duplizierung von Genomsequenzen wie sie beispielsweise auch bei Arabidopsis vorgekommen ist. So analysierten Tuskan *et al.* (2006), dass es zu einer kompletten Genomduplikation gefolgt von mehreren endständigen Fusionen zwischen zwei

getrennten Sätzen, jeweils bestehend aus vier Chromosomen, gekommen sein muss. Der erste Satz besteht aus den Chromosomen II, V, VII, XIV und der zweite aus I, XI, IV und IX. Auch wird postuliert, dass das ursprüngliche Pappelgenom aus nur 10 Chromosomen bestanden haben könnte. Nach der vollständigen Genomduplikation wurde dieser Chromosomensatz erweitert, was in einer Diploidisierung der verdoppelten Chromosomen und einer Neuorganisation des Genoms in 19 Chromosomen endete. Die Kollinearität genetischer Karten von unterschiedlichen *Populus* Arten legt die Vermutung nahe, dass diese Neuorganisation des Genoms vor der Evolution der heutigen unterscheidbaren *Populus* Arten stattgefunden hat (Namroud *et al.*, 2005; Pavy *et al.*, 2005).

Durch Sequenzanalysen konnte bei der Linie TS79-2 die FLPase tragende T-DNA (pbTSin1) auf dem größten Chromosom des Pappelgenoms (I: 35,5 Mb) an der Position 28,9 Mb lokalisiert werden. Die T-DNA pbTSin2 hat hingegen in einem der beschriebenen duplizierten Bereichen des Pappelgenoms, nämlich entweder auf dem Chromosom IV an Position 2,4 Mb oder auf dem Chromosom XI an der Position 2,7 Mb integriert. Aufgrund der stattgefundenen Verdopplung und der damit verbundenen hohen Homologie beider Regionen könnte es zwischen diesen verstärkt zur Ausbildung von *Crossing Over* kommen, was Rekombinationen dieser Bereiche mit anderen Chromosomen unwahrscheinlicher macht. Dies könnte ein Grund sein, weshalb es nicht zur Rekombination zwischen der T-DNA auf einem der beiden Chromosomen (IV oder XI) mit der T-DNA auf Chromosom I gekommen ist. Umgekehrt wäre die hohe Integrationsrate der Linie TS79-1 durch die Insertion beider T-DNAs in duplizierte Bereiche des Zitterpappelgenoms denkbar. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Inwieweit die Genkassetten vielleicht in kodierende Bereiche oder unter die Einwirkung von pappelspezifischen Promotoren ins Genom inseriert sind, lässt sich aufgrund fehlender Sequenzinformationen noch nicht sagen. Allen bisher identifizierten Insertionsorten ist jedoch gemeinsam, dass sie sich alle in endständigen Bereichen der Chromosomenstruktur befinden. Taddei *et al.* (2004) wiesen bereits daraufhin, dass sich im inneren Bereich der Chromosomen vorwiegend nicht-kodierende DNA und repetitive Elemente befinden, während in der Peripherie des Chromosoms meist kodierende DNA-Bereiche zu finden sind. Auch wenn die untersuchte Anzahl der Linien und der gefundenen Insertionsorte sehr gering ist, kann doch die Tendenz abgelesen werden, dass endständige Bereiche der Pappelchromosomen eher als „hot spots“ (Copenhaver *et al.*, 1998) der Integration von T-DNA dienen, als die innenliegenden Bereiche.

Die Integration konnte im Rahmen dieser Arbeit nur in Zitterpappellinien durchgeführt werden, da es nicht gelungen ist doppeltransgene Weizenlinien zu generieren. Die Resultate der Integrationsstudien bei Zitterpappel sollten aber bedingt auch auf Weizen übertragbar sein. Die geringere Effizienz der Exzision lässt auch vermuten, dass in Weizen die erfolgreiche Integration seltener auftritt, als bei Zitterpappel. Deshalb wäre hier für zukünftige Forschungsarbeiten die Verwendung einer codon-optimierten FLPase zu empfehlen.

### 4.4 Ausblick

Die hier durchgeführten Arbeiten zur sequenz-spezifischen Markergen-Eliminierung und zur zielgerichteten Integration von Transgenen zeigen die prinzipielle Verwendungsmöglichkeit des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems in den untersuchten Organismen. Darüber hinaus konnte erstmals in Weizen als auch in Zitterpappel erfolgreich gezeigt werden, dass die nachträgliche Exzision von Markergenen mit dem FLP/*FRT*-Rekombinationssystem möglich ist. Zwar findet die Exzision noch nicht in allen Pflanzen vollständig statt und auch die auftretende Exzisionsrate müsste noch für zukünftige Anwendungen gesteigert werden. Die Möglichkeit jedoch durch spezifische Eliminierung das Markergen aus transgenen Pflanzen zu entfernen, stellt gerade für kommerziell im Freiland angepflanzte transgene Pflanzen, einen hohen Gewinn dar. Denn laut der EU-Verordnung 2001/18/EG sollen ab 2009 keine transgenen Pflanzen für Freilandversuche und den kommerziellen Anbau zugelassen werden, die humanmedizinisch relevante Antibiotikaresistenzgene enthalten. Die zielgerichtete Integration in einen zuvor definierten Genomlocus ermöglicht die stabile und expressionsstarke Integration eines Transgens und vermeidet zusätzlich unvorhergesehene nachteilige Positioneffekte, die durch die zufällige Integration des Transgens auftreten können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals erfolgreich gelungen, durch sequenz-spezifische Rekombination ein promotorloses *bar*-Gen zielgerichtet in das Zitterpappelgenom mit einer Rate von bis zu 6,4% zu integrieren.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Herstellung von transgenen Pflanzen im Rahmen der Resistenzforschung aber auch für andere Fragestellungen werden Markergene zur Selektion eingesetzt. Da diese jedoch nach ihrer Selektion keine Funktion mehr ausüben erscheint es nicht nur im Hinblick auf die biologische Sicherheit transgener Pflanzen sinnvoll, diese nach ihrer Verwendung wieder zu entfernen. Darüber hinaus schränkt die EU-Richtlinie 2001/18/EG die Freisetzung von transgenen Pflanzen die Antibiotikaresistenzmarker enthalten ein, bzw. verbietet deren kommerzielle Zulassung bei Verwendung von Resistenzgenen humanmedizinisch relevanter Antibiotika. Neben der Exzision solcher Markergene ist auch die zielgerichtete Integration von Transgenen ein großes Ziel aktueller Forschungen. Da der Insertionsort eine entscheidende Rolle für die Transgenstabilität und -expression ausübt, ist es gerade für langlebige Bäume wie der Zitterpappel wichtig, Transgene an Positionen im Genom zu integrieren, die sich in Voruntersuchungen als geeignet erwiesen haben. Da sich durch eine zielgerichtete Integration außerdem mögliche Mutationen durch die Insertion des Transgens in kodierende Genombereiche oder unerwünschte Positionseffekte vermeiden lassen, wäre die Etablierung einer solchen Methode von großem Wert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich eine Methode zur Eliminierung von Markergenen sowie zur zielgerichteten Integration von Transgenen mit Hilfe des FLP/FRT-Rekombinationssystems aus Hefe in Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Zitterpappelhybriden (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides*) etabliert werden.

Dazu wurden zunächst verschiedene induzierbare Promotoren mittels PCR aus Reis und Weizen isoliert und mit dem GUS-Gen kombiniert. In transienten Expressionsstudien wurden diese Promotor-Konstrukte auf ihre Induzierbarkeit in Weizenembryonen untersucht. Der bereits in Vorversuchen in Zitterpappel eingesetzte hitzeinduzierbare Promotor Gmhsp17.5-E zeigte hierbei auch in Weizen eine hohe und ausschließliche hitzeinduzierbare Expression. Daher wurde er in den weiteren Klonierungsschritten zur Expression der FLP-Rekombinase in den Exzisions- und Integrationskonstrukten verwendet.

Durch biolistische Transformation von 5950 Weizenembryonen konnten 16 unabhängige Weizenlinien mit dem Exzisionskonstrukt (pTex) hergestellt werden. Mit der Agrobakterienvermittelten Transformationsmethode von Zitterpappelblattstücken konnten aus insgesamt 1193 Blattstücken sogar 27 transgene Linien mit dem Exzisionskonstrukt erhalten werden.

Nach Aktivierung des Rekombinationssystems in den transgenen Pflanzen konnte die dadurch ausgelöste Exzision der DNA erfolgreich durch histochemische GUS-Färbung in 31% der Weizenlinien und in 61% der Zitterpappellinien identifiziert werden. Darüber hinaus konnte die Exzision des verwendeten Kanamycin-Markergens (*nptII*) durch PCR- und Sequenzanalysen der DNA in beiden Pflanzen und zusätzlich auch durch Southern Blot Analysen verifiziert werden.

Für die nachfolgenden Integrationsstudien mit dem promotorlosen *bar*-Gen konnten insgesamt 12 unabhängige doppeltransgene Zitterpappellinien hergestellt werden. Das eine Konstrukt (TSin1) trägt die für die Rekombination nötige FLPase, auf dem anderen Konstrukt (TSin2) liegt von zwei *FRT-sites* flankiert das zum Nachweis der Integration verwendete promotorlose *bar*-Gen. Nach der Hitzeaktivierung von acht doppeltransgenen Zitterpappellinien konnten in bis zu 7,4% der Fälle putative Integrationsereignisse durch Selektion auf Basta<sup>®</sup>-haltigem Medium identifiziert werden. Anschließende PCR- und Sequenzanalysen mit genomischer DNA ergaben eine Integrationsrate des promotorlosen *bar*-Gens in den durch *FRT-sites* definierten Genomlocus von 6,4% bezogen auf die Gesamtanzahl der hitzebehandelten Pflanzenstücke. Und damit konnte erstmals in Bäumen eine zielgerichtete Integration eines Transgens (*bar*-Gen) mit einer so hohen Effizienz gezeigt werden.

Das in dieser Arbeit eingesetzte FLP/*FRT*-Rekombinationssystem stellt ein gutes Verfahren zur erfolgreichen Exzision eines Markers mit anschließender zielgerichteter Integration eines Fremdgens für die Herstellung transgener Pflanzen dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adang, M.J., Brody, M.S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R.T. *et al.*, **1993**. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol Biol*, **21**(6): 1131-45.
- Ainley, W.M. und Key, J.L., **1990**. Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: characterization of parameters for its use in transient expression assays. *Plant Mol Biol*, **14**(6): 949-67.
- Allen, G.C., Spiker, S. und Thompson, W.F., **2000**. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol*, **43**(2-3): 361-76.
- Andersson, M., Trifonova, A., Andersson, A.B., Johansson, M., Bulow, L. und Hofvander, P., **2003**. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. *Plant Cell Rep*, **22**(4): 261-7.
- Andrews, B.J., McLeod, M., Broach, J. und Sadowski, P.D., **1986**. Interaction of the FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 micron plasmid with mutated target sequences. *Mol Cell Biol*, **6**(7): 2482-9.
- Anke, T. und Thines, E., **2006**. Trends und Perspektiven moderner Fungizidforschung. *Schriftenreihe der DPG*, **8**: 92-103.
- Arciszewska, L.K., Grainge, I. und Sherratt, D.J., **1997**. Action of site-specific recombinases XerC and XerD on tethered Holliday junctions. *EMBO J*, **16**(12): 3731-43.
- Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E. *et al.*, **1986**. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J*, **5**(2): 433-40.
- Austin, S., Ziese, M. und Sternberg, N., **1981**. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, **25**(3): 729-36.
- Baer, A. und Bode, J., **2001**. Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotechnol*, **12**(5): 473-80.
- Baubonis, W. und Sauer, B., **1993**. Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res*, **21**(9): 2025-9.
- Becker, D., Brettschneider, R. und Lorz, H., **1994**. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J*, **5**(2): 299-307.
- Belzile, F., Lassner, M.W., Tong, Y., Khush, R. und Yoder, J.I., **1989**. Sexual transmission of transposed activator elements in transgenic tomatoes. *Genetics*, **123**(1): 181-9.
- Bethke, B. und Sauer, B., **1997**. Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants. *Nucleic Acids Res*, **25**(14): 2828-34.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B. und Chilton, M.D., **1983**. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, **304**: 184-7.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. und Potrykus, I., **2002**. Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr*, **132**(3): 506-10.
- Blatter, R. und Wolfe, M.S., **1995**. Die Verwendung molekularbiologischer Technologien zur Erzeugung von Wirtsresistenz gegen Schadenserreger: Mögliche Folgen bezüglich einer Anpassung der Krankheiten und Schädlinge. Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich, Zürich.
- Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schubeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E. und Nikolaev, L., **2000**. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem*, **381**(9-10): 801-13.

- Bode, J., Goetze, S., Heng, H., Krawetz, S.A. und Benham, C., **2003**. From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res*, **11**(5): 435-45.
- Botta, D., White, C.C., Vliet-Gregg, P., Mohar, I., Shi, S., McGrath, M.B., McConnachie, L.A. und Kavanagh, T.J., **2008**. Modulating GSH synthesis using glutamate cysteine ligase transgenic and gene-targeted mice. *Drug Metab Rev*, **40**(3): 465-77.
- Breitler, J.C., Meynard, D., Van Boxtel, J., Royer, M., Bonnot, F., Cambillau, L. und Guiderdoni, E., **2004**. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Res*, **13**(3): 271-87.
- Broach, J.R., Guarascio, V.R. und Jayaram, M., **1982**. Recombination within the yeast plasmid 2 $\mu$  circle is site-specific. *Cell*, **29**(1): 227-34.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.O., Rossi, F. und Stewart, A.F., **1996**. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, **24**(21): 4256-62.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. und Stewart, A.F., **1998**. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, **16**(7): 657-62.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M., **1987**. XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**: 376-9.
- Campbell, M.A., Fitzgerald, H.A. und Ronald, P.C., **2002**. Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Res*, **11**(6): 599-613.
- Chen, J.M., Carlson, A.R., Wan, J.M. und Kasha, K.J., **2003**. Chromosomal location and expression of green fluorescent protein (*gfp*) gene in microspore derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *Yi Chuan Xue Bao*, **30**(8): 697-705.
- Chen, Y., Narendra, U., Iype, L.E., Cox, M.M. und Rice, P.A., **2000**. Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell*, **6**(4): 885-97.
- Chen, Y. und Rice, P.A., **2003**. New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **32**: 135-59.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. und Zhu, J.K., **2007**. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*, **12**(10): 444-51.
- Church, G.M. und Gilbert, W., **1984**. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(7): 1991-5.
- Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E. und Stalker, D.M., **2005**. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*, **317**: 741-4.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A. und Bisoffi, S., **1994**. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep*, **13**: 256-61.
- Copenhaver, G.P., Browne, W.E. und Preuss, D., **1998**. Assaying genome-wide recombination and centromere functions with Arabidopsis tetrads. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(1): 247-52.
- Coppoolse, E.R., de Vroomen, M.J., Roelofs, D., Smit, J., van Gennip, F., Hersmus, B.J., Nijkamp, H.J. und van Haaren, M.J., **2003**. Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants. *Plant Mol Biol*, **51**(2): 263-79.
- Crellin, P.K. und Rood, J.I., **1997**. The resolvase/invertase domain of the site-specific recombinase TnpX is functional and recognizes a target sequence that resembles the junction of the circular form of the *Clostridium perfringens* transposon Tn4451. *J Bacteriol*, **179**(16): 5148-56.
- Curtis, I.S., Davey, M.R. und Power, J.B., **1995**. Leaf disk transformation. *Methods Mol Biol*, **44**: 59-70.



- Czarnecka, E., Gurley, W.B., Nagao, R.T., Mosquera, L.A. und Key, J.L., **1985**. DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(11): 3726-30.
- Czarnecka, E., Key, J.L. und Gurley, W.B., **1989**. Regulatory domains of the Gmhsp17.5-E heat shock promoter of soybean. *Mol Cell Biol*, **9**(8): 3457-63.
- Czarnecka, E., Fox, P.C. und Gurley, W.B., **1990**. In Vitro Interaction of Nuclear Proteins with the Promoter of Soybean Heat Shock Gene Gmhsp17.5E. *Plant Physiol*, **94**(3): 935-43.
- Czarnecka, E., Ingersoll, J.C. und Gurley, W.B., **1992**. AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene Gmhsp17.5E bind two distinct sets of nuclear proteins in vitro. *Plant Mol Biol*, **19**(6): 985-1000.
- Dale, E.C. und Ow, D.W., **1991**. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(23): 10558-62.
- Daniell, H., **2002**. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol*, **20**(6): 581-6.
- de Groot, M.J., Offringa, R., Does, M.P., Hooykaas, P.J. und van den Elzen, P.J., **1992**. Mechanisms of intermolecular homologous recombination in plants as studied with single- and double-stranded DNA molecules. *Nucleic Acids Res*, **20**(11): 2785-94.
- de Groot, M.J., Offringa, R., Groet, J., Does, M.P., Hooykaas, P.J. und van den Elzen, P.J., **1994**. Non-recombinant background in gene targeting: illegitimate recombination between a hpt gene and a defective 5' deleted nptII gene can restore a Kmr phenotype in tobacco. *Plant Mol Biol*, **25**(4): 721-33.
- de Vetten, N., Wolters, A.M., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P. und Visser, R., **2003**. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol*, **21**(4): 439-42.
- Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, L., Van Montagu, M. und Schell, J., **1983**. Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *EMBO J*, **2**(3): 419-26.
- Diaz, V., Rojo, F., Martinez, A.C., Alonso, J.C. und Bernad, A., **1999**. The prokaryotic beta-recombinase catalyzes site-specific recombination in mammalian cells. *J Biol Chem*, **274**(10): 6634-40.
- Diaz, V., Servert, P., Prieto, I., Gonzalez, M.A., Martinez, A.C., Alonso, J.C. und Bernad, A., **2001**. New insights into host factor requirements for prokaryotic beta-recombinase-mediated reactions in mammalian cells. *J Biol Chem*, **276**(19): 16257-64.
- Dimitri, P., Corradini, N., Rossi, F. und Verni, F., **2005**. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays*, **27**(1): 29-41.
- Djukanovic, V., Orczyk, W., Gao, H., Sun, X., Garrett, N. *et al.*, **2006**. Gene conversion in transgenic maize plants expressing FLP/FRT and Cre/loxP site-specific recombination systems. *Plant Biotechnol J*, **4**(3): 345-57.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S. und Smithies, O., **1987**. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **330**(6148): 576-8.
- Doyle, J.J. und Doyle, J.L., **1987**. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, **19**: 11-15.
- Droge, M., Puhler, A. und Selbitschka, W., **1998**. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J Biotechnol*, **64**(1): 75-90.
- Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. und Yamakado, M., **1997**. Selection of marker-free transgenic plants using the isopenentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(6): 2117-21.
- Erkine, A.M., Magrogan, S.F., Sekinger, E.A. und Gross, D.S., **1999**. Cooperative binding of heat shock factor to the yeast HSP82 promoter in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, **19**(3): 1627-39.

- Fedoryshyn, M., Petzke, L., Welle, E., Bechthold, A. und Luzhetskyy, A., **2008**. Marker removal from actinomycetes genome using Flp recombinase. *Gene*, **419**(1-2): 43-7.
- Feng, J.A., Johnson, R.C. und Dickerson, R.E., **1994**. Hin recombinase bound to DNA: the origin of specificity in major and minor groove interactions. *Science*, **263**(5145): 348-55.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J.C., McCoen, B., Haissig, B.E. und Comai, L., **1987**. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet*, **206**: 192-9.
- Fitzgerald, J.R., **2007**. Targeted gene disruption for the analysis of virulence of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol*, **391**: 103-12.
- Fladung, M. und Ahuja, R., **1995**. "Sandwich" Method for Nonradioactive Hybridization. *BioTechniques*, **18**(5): 802.
- Fladung, M., Kumar, S. und Ahuja, M.R., **1997**. Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: Transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Res*, **6**: 111-21.
- Fladung, M., **1999**. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Mol Gen Genet*, **260**(6): 574-81.
- Fladung, M., Deutsch, F., Honicka, H. und Kumar, S., **2004**. T-DNA and transposon tagging in aspen. *Plant Biol (Stuttg)*, **6**(1): 5-11.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Kumar, S. und Hoenicka, H., **2005**. The site-specific recombination systems Cre-lox and FLP-FRT are functionally active in poplar. *Forest Genet*, **12**(2): 121-30.
- Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S. und Sarhan, F., **2001**. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol*, **127**(4): 1676-81.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S. *et al.*, **1983**. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(15): 4803-7.
- Franklin, K.A. und Whitelam, G.C., **2007**. Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, **39**(11): 1410-3.
- Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. und Shimamoto, K., **1993**. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology (N Y)*, **11**(10): 1151-5.
- Futcher, A.B. und Cox, B.S., **1984**. Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **157**(1): 283-90.
- Futcher, A.B., **1986**. Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol*, **119**(2): 197-204.
- Gallego, M.E., Sirand-Pugnet, P. und White, C.I., **1999**. Positive-negative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation. *Plant Mol Biol*, **39**(1): 83-93.
- Ganeshan, S., Vitamvas, P., Fowler, D.B. und Chibbar, R.N., **2008**. Quantitative expression analysis of selected COR genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen. *J Exp Bot*, **59**(9): 2393-402.
- Gidoni, D., Srivastava, V. und Carmi, N., **2008**. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.*: (in press).
- Gilbertson, L., **2003**. Cre-lox recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends Biotechnol*, **21**(12): 550-5.
- Gisler, B., Salomon, S. und Puchta, H., **2002**. The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *Plant J*, **32**(3): 277-84.

- Golic, K.G. und Lindquist, S., **1989**. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, **59**(3): 499-509.
- Gross, D.S., Adams, C.C., Lee, S. und Stentz, B., **1993**. A critical role for heat shock transcription factor in establishing a nucleosome-free region over the TATA-initiation site of the yeast HSP82 heat shock gene. *EMBO J*, **12**(10): 3931-45.
- Grundy, F.J. und Howe, M.M., **1984**. Involvement of the invertible G segment in bacteriophage mu tail fiber biosynthesis. *Virology*, **134**(2): 296-317.
- Guo, F., Gopaul, D.N. und van Duyne, G.D., **1997**. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, **389**(6646): 40-6.
- Haber, J.E., **1998**. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **32**: 561-99.
- Han, K.-H., Meilan, R., Ma, C. und Strauss, S.H., **2000**. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Rep*, **19**: 315-20.
- Hanahan, D., **1983**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**(4): 557-80.
- Hansen, G. und Wright, M.S., **1999**. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci*, **4**(6): 226-31.
- Hare, P.D. und Chua, N.H., **2002**. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat Biotechnol*, **20**(6): 575-80.
- Hartung, F., Suer, S. und Puchta, H., **2007**. Two closely related RecQ helicases have antagonistic roles in homologous recombination and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(47): 18836-41.
- Herrera-Estrella, L., Block, M.D., Messens, E., Hernalsteens, J.P., Montagu, M.V. und Schell, J., **1983**. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J*, **2**(6): 987-995.
- Hoa, T.T., Bong, B.B., Huq, E. und Hodges, T.K., **2002**. Cre/ lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor Appl Genet*, **104**(4): 518-25.
- Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M. und de Boer, H.A., **1987**. Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol*, **7**(8): 2914-24.
- Hoess, R.H. und Abremski, K., **1985**. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Mol Biol*, **181**(3): 351-62.
- Hoff, T., Schnorr, K.M. und Mundy, J., **2001**. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, **45**(1): 41-9.
- Hofgen, R. und Willmitzer, L., **1988**. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res*, **16**(20): 9877.
- Hohn, B. und Puchta, H., **1999**. Gene therapy in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(15): 8321-3.
- Hohn, B., Levy, A.A. und Puchta, H., **2001**. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, **12**(2): 139-43.
- Igasaki, T., Mohri, T., Ichikawa, H. und Shinohara, K., **2000**. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell Rep*, **19**: 448-53.
- Iizumi, S., Kurosawa, A., So, S., Ishii, Y., Chikaraishi, Y., Ishii, A., Koyama, H. und Adachi, N., **2008**. Impact of non-homologous end-joining deficiency on random and targeted DNA integration: implications for gene targeting. *Nucleic Acids Res*: (in press).
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H., **1990**. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**(1): 23-8.

- Jayaram, M., **1985**. Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(17): 5875-9.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. und Hirsh, D., **1986**. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(22): 8447-51.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. und Bevan, M.W., **1987**. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**(13): 3901-7.
- Johzuka-Hisatomi, Y., Terada, R. und Iida, S., **2008**. Efficient transfer of base changes from a vector to the rice genome by homologous recombination: involvement of heteroduplex formation and mismatch correction. *Nucleic Acids Res*, **36**(14): 4727-35.
- Jones, P.A. und Takai, D., **2001**. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**(5532): 1068-70.
- Joubes, J., De Schutter, K., Verkest, A., Inze, D. und De Veylder, L., **2004**. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J*, **37**(6): 889-96.
- Kanki, H., Suzuki, H. und Itohara, S., **2006**. High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp Anim*, **55**(2): 137-41.
- Karlin, S., Campbell, A.M. und Mrazek, J., **1998**. Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annu Rev Genet*, **32**: 185-225.
- Keese, P., **2008**. Risks from GMOs due to Horizontal Gene Transfer. *Environ Biosafety Res*, **7**(3): 123-49.
- Kerbach, S., Lorz, H. und Becker, D., **2005**. Site-specific recombination in *Zea mays*. *Theor Appl Genet*, **111**(8): 1608-16.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. und Murray, J.A., **1993**. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, **9**(12): 413-21.
- Kilby, N.J., Davies, G.J. und Snaith, M.R., **1995**. FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in Arabidopsis. *Plant J*, **8**(5): 637-52.
- Kilby, N.J., Fyvie, M.J., Sessions, R.A., Davies, G.J. und Murray, J.A., **2000**. Controlled induction of GUS marked clonal sectors in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **51**(346): 853-63.
- Kishore, G.M. und Shah, D.M., **1988**. Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides. *Annu Rev Biochem*, **57**: 627-63.
- Kittiwongwattana, C., Lutz, K., Clark, M. und Maliga, P., **2007**. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, **64**(1-2): 137-43.
- Kobbe, D., Blanck, S., Demand, K., Focke, M. und Puchta, H., **2008**. AtRECQ2, a RecQ helicase homologue from *Arabidopsis thaliana*, is able to disrupt various recombinogenic DNA structures in vitro. *Plant J*, **55**(3): 397-405.
- Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D.A. und Christou, P., **1999**. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, **208**: 88-97.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. und Kumashiro, T., **1996**. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, **10**(1): 165-74.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H., Redei, G.P. und Schell, J., **1989**. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(21): 8467-71.
- Kooter, J.M., Matzke, M.A. und Meyer, P., **1999**. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci*, **4**(9): 340-7.

- Kopertekh, L., Juttner, G. und Schiemann, J., **2004**. PVX-Cre-mediated marker gene elimination from transgenic plants. *Plant Mol Biol*, **55**(4): 491-500.
- Kuckuck, H., Kobabe, G. und Wenzel, G., **1985**. Grundzüge der Pflanzen-Züchtung. Walter de Gruyter Verlag.
- Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn, H.P. und Kok, E.J., **2001**. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*, **27**(6): 503-28.
- Kumar, S. und Fladung, M., **2000a**. Determination of transgene repeat formation and promoter methylation in transgenic plants. *BioTechniques*, **28**(6): 1128 1130, 1132, 1134 passim.
- Kumar, S. und Fladung, M., **2000b**. Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Mol Gen Genet*, **264**(1-2): 20-8.
- Kumar, S. und Fladung, M., **2001a**. Controlling transgene integration in plants. *Trends Plant Sci*, **6**(4): 155-9.
- Kumar, S. und Fladung, M., **2001b**. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta*, **213**(5): 731-40.
- Kumar, S. und Fladung, M., **2002**. Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J*, **31**(4): 543-51.
- Kunkel, T., Niu, Q.W., Chan, Y.S. und Chua, N.H., **1999**. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nat Biotechnol*, **17**(9): 916-9.
- Kutsukake, K., Nakashima, H., Tominaga, A. und Abo, T., **2006**. Two DNA invertases contribute to flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2. *J Bacteriol*, **188**(3): 950-7.
- Langer, M., Sniderhan, L.F., Grossniklaus, U. und Ray, A., **2007**. Transposon excision from an atypical site: a mechanism of evolution of novel transposable elements. *PLoS ONE*, **2**(10): e965.
- Lauth, M., Spreafico, F., Dethleffsen, K. und Meyer, M., **2002**. Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res*, **30**(21): e115.
- Lee, S. und Gross, D.S., **1993**. Conditional silencing: the HMRE mating-type silencer exerts a rapidly reversible position effect on the yeast HSP82 heat shock gene. *Mol Cell Biol*, **13**(2): 727-38.
- Leung, R.K. und Whittaker, P.A., **2005**. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*, **107**(2): 222-39.
- Levy, A.A. und Walbot, V., **1990**. Regulation of the timing of transposable element excision during maize development. *Science*, **248**(4962): 1534-7.
- Lorbach, E., Christ, N., Schwikardi, M. und Droge, P., **2000**. Site-specific recombination in human cells catalyzed by phage lambda integrase mutants. *J Mol Biol*, **296**(5): 1175-81.
- Louwerse, J.D., van Lier, M.C., van der Steen, D.M., de Vlaam, C.M., Hooykaas, P.J. und Vergunst, A.C., **2007**. Stable recombinase-mediated cassette exchange in Arabidopsis using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, **145**(4): 1282-93.
- Lu, H.J., Zhou, X.R., Gong, Z.X. und Upadhyaya, N.M., **2001**. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double-right border (DRB) binary vectors. *J Plant Physiol*, **28**: 241-8.
- Luo, K., Duan, H., Zhao, D., Zheng, X., Deng, W. *et al.*, **2007**. 'GM-gene-deletor': fused loxP-FRT recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, **5**(2): 263-74.
- Lutz, K.A., Corneille, S., Azhagiri, A.K., Svab, Z. und Maliga, P., **2004**. A novel approach to plastid transformation utilizes the phiC31 phage integrase. *Plant J*, **37**(6): 906-13.
- Lydon, J. und Duke, S.O., **1999**. Inhibitors of glutamine biosynthesis. In: B.K. Singh (Editor), *Plant Amino Acids*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 445-64.

- Lyznik, L.A., Hirayama, L., Rao, K.V., Abad, A. und Hodges, T.K., **1995**. Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *Plant J*, **8**(2): 177-86.
- Lyznik, L.A., Gordon-Kamm, W.J. und Tao, Y., **2003**. Site-specific recombination for genetic engineering in plants. *Plant Cell Rep*, **21**(10): 925-32.
- Maerlaender, B. und Tiedemann, A.v., **2006**. Herbizidtolerante Kulturpflanzen - Anwendungspotenziale und Perspektiven. *Schriftenreihe der DPG*, **8**: 32-45.
- Maeser, S. und Kahmann, R., **1991**. The Gin recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol Gen Genet*, **230**(1-2): 170-6.
- Maggert, K.A., Gong, W.J. und Golic, K.G., **2008**. Methods for homologous recombination in Drosophila. *Methods Mol Biol*, **420**: 155-74.
- Matzke, A.J. und Matzke, M.A., **1998**. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol*, **1**(2): 142-8.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J. und Matzke, A.J., **1989**. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J*, **8**(3): 643-649.
- Matzke, M.A., Neuhuber, F. und Matzke, A.J., **1993**. A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing. *Mol Gen Genet*, **236**(2-3): 379-86.
- Matzke, M.A., Mette, M.F. und Matzke, A.J.M., **2000**. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol*, **43**: 401-415.
- Maul, R.W. und Sutton, M.D., **2005**. Roles of the *Escherichia coli* RecA protein and the global SOS response in effecting DNA polymerase selection in vivo. *J Bacteriol*, **187**(22): 7607-18.
- McLeod, M., Craft, S. und Broach, J.R., **1986**. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol*, **6**(10): 3357-67.
- Meyer, P., Heidmann, I. und Niedenhof, I., **1993**. Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant J*, **4**(1): 89-100.
- Meyer, P., **1995**. Freisetzung transgener Petunien: Ergebnisse des Versuchs der Begleitforschung. In: S. Albrecht und V. Beusmann (Editors), *Ökologie transgener Nutzpflanzen*. Campus Verlag, Frankfurt, pp. 75-80.
- Meyer, P., **1996**. Inactivation of gene expression in transgenic plants. In: J. Tomiuk, K. Woehrmann und A. Sentker (Editors), *Transgenic Organisms - Biological and Social Implications*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 5-19.
- Michael, T.P., Salome, P.A. und McClung, C.R., **2003**. Two Arabidopsis circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(11): 6878-83.
- Miki, B. und McHugh, S., **2004**. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, **107**(3): 193-232.
- Miller, J.H., **1972**. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 468 pp.
- Mittelsten Scheid, O., Afsar, K. und Paszkowski, J., **1998**. Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(2): 632-7.
- Moeser, J., **2006**. Insektenresistente transgene Nutzpflanzen in Westeuropa: Status und Perspektiven. *Schriftenreihe der DPG*, **8**: 69-79.
- Monier, J.M., Bernillon, D., Kay, E., Faugier, A., Rybalka, O., Dessaux, Y., Simonet, P. und Vogel, T.M., **2007**. Detection of potential transgenic plant DNA recipients among soil bacteria. *Environ Biosafety Res*, **6**(1-2): 71-83.

- Monroy, A.F., Dryanova, A., Malette, B., Oren, D.H., Ridha Farajalla, M. *et al.*, **2007**. Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol Biol*, **64**(4): 409-23.
- Mosig, G., **1998**. Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu Rev Genet*, **32**: 379-413.
- Murai, N., Kemp, J.D., Sutton, D.W., Murray, M.G., Slightom, J.L. *et al.*, **1983**. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science*, **222**(4623): 476-82.
- Nagy, A., **2000**. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, **26**(2): 99-109.
- Namroud, M.C., Park, A., Tremblay, F. und Bergeron, Y., **2005**. Clonal and spatial genetic structures of aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Mol Ecol*, **14**(10): 2969-80.
- Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. und Hansen, G., **2000**. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep*, **19**: 798-803.
- Neumann, K., Droge-Laser, W., Kohne, S. und Broer, I., **1997**. Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiol*, **115**(3): 939-47.
- Newell, C.A., **2000**. Plant transformation technology. Developments and applications. *Mol Biotechnol*, **16**(1): 53-65.
- Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. und van Elsas, J.D., **1998**. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria--a rare event? *FEMS Microbiol Rev*, **22**(2): 79-103.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. und Smalla, K., **2000**. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413(pFG4DeltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl Environ Microbiol*, **66**(3): 1237-42.
- Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D. und Daffonchio, D., **2007**. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res*, **6**(1-2): 37-53.
- Nunes-Duby, S.E., Azaro, M.A. und Landy, A., **1995**. Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol*, **5**(2): 139-48.
- O'Gorman, S., Fox, D.T. und Wahl, G.M., **1991**. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, **251**(4999): 1351-5.
- Ochman, H., Gerber, A.S. und Hartl, D.L., **1988**. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, **120**(3): 621-3.
- Odell, J.T. und Russell, S.H., **1994**. Use of Site-Specific Recombination Systems in Plants. In: J. Paskowski (Editor), *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Basel, pp. 219-70.
- Offringa, R., Franke-van Dijk, M.E., De Groot, M.J., van den Elzen, P.J. und Hooykaas, P.J., **1993**. Nonreciprocal homologous recombination between *Agrobacterium* transferred DNA and a plant chromosomal locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(15): 7346-50.
- Orban, P.C., Chui, D. und Marth, J.D., **1992**. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(15): 6861-5.
- Osborne, B.I. und Baker, B., **1995**. Movers and shakers: maize transposons as tools for analyzing other plant genomes. *Curr Opin Cell Biol*, **7**(3): 406-13.
- Osborne, B.I., Wirtz, U. und Baker, B., **1995**. A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J*, **7**(4): 687-701.
- Oszvald, M., Kang, T.J., Tomoskozi, S., Jenes, B., Kim, T.G., Cha, Y.S., Tamas, L. und Yang, M.S., **2008**. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm. *Mol Biotechnol*, **40**(3): 261-8.

- Ouellet, F., Vazquez-Tello, A. und Sarhan, F., **1998**. The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Lett*, **423**: 324-8.
- Ow, D.W., **2002**. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol Biol*, **48**(1-2): 183-200.
- Ow, D.W. und Srivastava, V., **2003**. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Plant Molecular Biology*, **52**(3): 661-8.
- Pallotta, M.A., Graham, R.D., Langridge, P., Sparrow, D.H.B. und Barker, S.J., **2000**. RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theor Appl Genet*, **101**: 1100-8.
- Paszkowski, J., Baur, M., Bogucki, A. und Potrykus, I., **1988**. Gene targeting in plants. *EMBO J*, **7**(13): 4021-4026.
- Pavy, N., Paule, C., Parsons, L., Crow, J.A., Morency, M.J. *et al.*, **2005**. Generation, annotation, analysis and database integration of 16,500 white spruce EST clusters. *BMC Genomics*, **6**: 144.
- Plasterk, R.H., Ilmer, T.A. und Van de Putte, P., **1983**. Site-specific recombination by Gin of bacteriophage Mu: inversions and deletions. *Virology*, **127**(1): 24-36.
- Prandl, R. und Schoffl, F., **1996**. Heat shock elements are involved in heat shock promoter activation during tobacco seed maturation. *Plant Mol Biol*, **31**(1): 157-62.
- Puchta, H. und Hohn, B., **1991**. The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol Gen Genet*, **230**(1-2): 1-7.
- Puchta, H., Kocher, S. und Hohn, B., **1992**. Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG methylation. *Mol Cell Biol*, **12**(8): 3372-9.
- Puchta, H., **1998**. Towards targeted transformation in plants. *Trends Plant Sci*, **3**: 77-8.
- Puchta, H., **1999a**. Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics*, **152**(3): 1173-81.
- Puchta, H., **1999b**. Use of I-Sce I to induce DNA double-strand breaks in *Nicotiana*. *Methods Mol Biol*, **113**: 447-51.
- Puchta, H., **2000**. Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci*, **5**(7): 273-4.
- Puchta, H., **2002**. Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol Biol*, **48**(1-2): 173-82.
- Ragan, M.A. und Charlebois, R.L., **2002**. Distributional profiles of homologous open reading frames among bacterial phyla: implications for vertical and lateral transmission. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**(Pt 3): 777-87.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R. und Stewart, A.F., **1998**. Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J Mol Biol*, **284**(2): 363-84.
- Rodriguez, S.A., Yu, J.J., Davis, G., Arulanandam, B.P. und Klose, K.E., **2008**. Targeted inactivation of *francisella tularensis* genes by group II introns. *Appl Environ Microbiol*, **74**(9): 2619-26.
- Rubtsova, M., Kempe, K., Gils, A., Ismagul, A., Weyen, J. und Gils, M., **2008**. Expression of active *Streptomyces* phage phiC31 integrase in transgenic wheat plants. *Plant Cell Rep*: (in press).
- Rudd, S., Frisch, M., Grote, K., Meyers, B.C., Mayer, K. und Werner, T., **2004**. Genome-wide in silico mapping of scaffold/matrix attachment regions in *Arabidopsis* suggests correlation of intragenic scaffold/matrix attachment regions with gene expression. *Plant Physiol*, **135**(2): 715-22.
- Saedler, H. und Schuchert, W., **2001**. Biotechnologie in der Pflanzenproduktion. In: S. Heiden, R. Erb und C. Burschel (Editors), Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung. Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 384.



- Saidi, Y., Finka, A., Chakhporanian, M., Zryd, J.P., Schaefer, D.G. und Goloubinoff, P., **2005**. Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Mol Biol*, **59**(5): 697-711.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., **1989**. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1659 pp.
- Sauer, B. und Henderson, N., **1988**. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(14): 5166-70.
- Schaefer, D., Zryd, J.P., Knight, C.D. und Cove, D.J., **1991**. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, **226**(3): 418-24.
- Schaefer, D.G. und Zryd, J.P., **1997**. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, **11**(6): 1195-206.
- Schuette, G. und Schmitz, G., **2001**. Wissensstand zu den Auswirkungen spezieller gentechnisch vermittelter Eigenschaften - Herbizidresistenz. In: G. Schuette, S. Stirn und V. Beusmann (Editors), Transgene Nutzpflanzen. Sicherheitsforschung, Risikoabschätzung und Nachgenehmigungs-Monitoring. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 102-22.
- Schulze-Lefert, P. und Panstruga, R., **2003**. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **41**: 641-67.
- Seibler, J. und Bode, J., **1997**. Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay. *Biochemistry*, **36**(7): 1740-7.
- Shaikh, A.C. und Sadowski, P.D., **2000**. Trans complementation of variant Cre proteins for defects in cleavage and synapsis. *J Biol Chem*, **275**(39): 30186-95.
- Shao, N. und Bock, R., **2008**. A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, **53**(6): 381-8.
- Shastry, B.S., **1994**. More to learn from gene knockouts. *Mol Cell Biochem*, **136**(2): 171-82.
- Shinagawa, H., Iwasaki, H., Kato, T. und Nakata, A., **1988**. RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(6): 1806-10.
- Siebert, R. und Puchta, H., **2002**. Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell*, **14**(5): 1121-31.
- Sijahril, R., Chin, D.P., Khan, R.S., Yamamura, S., Nakamura, I., Amemiya, Y. und Mii, M., **2006**. Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotechnol J*, **23**: 191-4.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Gray, J., Bird, C.R., Morris, P.C., Schuch, W. und Grierson, D., **1988**. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, **334**: 724-6.
- Song, H. und Niederweis, M., **2007**. Functional expression of the Flp recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*, **399**(2): 112-9.
- Southern, E.M., **1975**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**(3): 503-17.
- Stahl, D.J., **2006**. Einsatz gentechnischer Methoden zur Verbesserung der Kulturpflanzenresistenz gegenüber parasitären Pilzen. *Schriftenreihe der DPG*, **8**: 80-91.
- Stam, M., Mol, J.N.M. und Kooter, J.M., **1997**. The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.*, **79**: 3-12.
- Sternberg, N. und Hamilton, D., **1981**. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, **150**(4): 467-86.

- Sternberg, N., Hamilton, D. und Hoess, R., **1981a**. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, **150**(4): 487-507.
- Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M. und Hoess, R., **1981b**. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **45 Pt 1**: 297-309.
- Stiekema, W.J., Visser, B. und Florack, D.E., **1993**. Is durable resistance against viruses and bacteria attainable via biotechnology? In: T. Jacobs und J.E. Parleyliet (Editors), Durability of Disease Resistance. Kluwer Academic publishers, London, U.K., pp. 71-81.
- Sunaga, S., Maki, K., Komagata, Y., Ikuta, K. und Miyazaki, J.I., **1997**. Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of Cre recombinase in fertilized eggs. *Mol Reprod Dev*, **46**(2): 109-13.
- Sutton, D.W., Havstad, P.K. und Kemp, J.D., **1992**. Synthetic *cryIIIa* gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Res*, **1**(5): 228-36.
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R. und Gasser, S.M., **2004**. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet*, **38**: 305-45.
- Thorpe, H.M. und Smith, M.C., **1998**. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(10): 5505-10.
- Thykjaer, T., Finnemann, J., Schauser, L., Christensen, L., Poulsen, C. und Stougaard, J., **1997**. Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant Mol Biol*, **35**(4): 523-30.
- Trigiano, R.N. und Gray, D.J., **2004**. Plant Development and Biotechnology. CRC Press, 376 pp.
- Tsuboi, T., Takeo, S., Iriko, H., Jin, L., Tsuchimochi, M. *et al.*, **2008**. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun*, **76**(4): 1702-8.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I. *et al.*, **2006**. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, **313**(5793): 1596-604.
- van de Putte, P., Cramer, S. und Giphart-Gassler, M., **1980**. Invertible DNA determines host specificity of bacteriophage mu. *Nature*, **286**(5770): 218-22.
- Van Duyne, G.D., **2001**. A structural view of cre-loxP site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**: 87-104.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. und Rocha-Sosa, M., **1990**. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet*, **220**(2): 245-50.
- Varrelmann, M., **2006**. Virusresistente transgene Pflanzen - Mechanismus und Nutzungsmöglichkeiten. *Schriftenreihe der DPG*, **8**: 46-68.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C. *et al.*, **1998**. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*, **16**(6): 651-9.
- Vazquez-Tello, A., Ouellet, F. und Sarhan, F., **1998**. Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of Wcs120, a cold-specific gene in wheat. *Mol Gen Genet*, **257**(2): 157-66.
- Vergunst, A.C. und Hooykaas, P.J., **1998**. Cre/lox-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre. *Plant Mol Biol*, **38**(3): 393-406.
- Vergunst, A.C. und Hooykaas, P.J., **1999**. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. *Crit Rev Plant Sci*, **18**: 1-31.

- Vries, J.d., Brandt, P. und Wachernagel, W., **2003**. Dreizehnter Bericht nach Inkrafttreten des Gentechnikgesetzes für den Zeitraum vom 1.1.2002 bis 31.12.2002. Tätigkeitsbericht der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit im Jahr 2002. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. Springer, Heidelberg, 514-25 pp.
- Walther, A. und Wendland, J., **2008**. PCR-based gene targeting in *Candida albicans*. *Nat Protoc*, **3**(9): 1414-21.
- White, P.R., **1943**. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth*, **7**: 53-65.
- Wiedemann, B. und Boles, E., **2008**. Codon-optimized bacterial genes improve L-Arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **74**(7): 2043-50.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. und Puhler, A., **1988**. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*, **70**(1): 25-37.
- Yu, Y. und Bradley, A., **2001**. Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet*, **2**(10): 780-90.
- Zhang, J., Li, J., Huang, C., Xue, L., Peng, Y., Fu, Q., Gao, L. und Li, W., **2008**. Targeted knockout of the mouse beta B2-crystallin gene (*Crybb2*) induces age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*: (in press).
- Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V. und Gilbertson, L., **2003**. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor Appl Genet*, **107**(7): 1157-68.
- Zhu, B., Chen, T.H. und Li, P.H., **1996**. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta*, **198**(1): 70-7.
- Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczynski, C.L. und Bowen, B., **1999**. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(15): 8768-73.
- Zubko, E., Scutt, C. und Meyer, P., **2000**. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat Biotechnol*, **18**(4): 442-5.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Moller, S.G. und Chua, N.H., **2001**. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol*, **19**(2): 157-61.
- Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG.; *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*; **L106**; 1-38

## 7 Anhang

### wcs120

Alignment der publizierten Sequenz (Query) des Promotors wcs120 mit der PCR-amplifizierten Sequenz (Sbjct):

```

Query 1      GGACGACAACGCGGTCAGTCGCGGCAGAGGCGGCGTCGGACATCGGGCCGTTACGTCCG 60
|
|
|
Sbjct 1      GGACGACAACGCGGTCAGTCGCGGCAGAGGCGGCGTCGGACATCGGGCCGTTACGTCCG 60

Query 61     CGGTGTTCGGACGGGGACGGTGAGATGCGGTGTTCGAACGTCGGGCGTTACGTCCGCGTC 120
|
|
|
Sbjct 61     CGGTGTTCGGACGGGGACGGTGAGATGCGGTGTTCGAACGTCGGGCGTTACGTCCGCGTC 120

Query 121    GTCGGACGGGCACGGTGAGATGCGGCGTCGGGCGGGGTGGGACGGCGGCGATCGGCCAG 180
|
|
|
Sbjct 121    GTCGGACGGGCACGGTGAGATGCGGCGTCGGGCGGGGTGGGACGGCGGCGATCGGCCAG 180

Query 181    TTGGAAAAATGGAACGGGAGGAGCATGATCGCCGGGCGGGCGAGAAGATCATGCAACTGC 240
|
|
|
Sbjct 181    TTGGAAAAATGGAACGGGAGGAGCATGATCGCCGGGCGGGCGAGAAGATCATGCAACTGC 240

Query 241    CTCTTTTTTCCCGTACACGGGCGATGCCTTTTTTTTTTGCATCCGCGGGTATACGTACG 300
|
|
|
Sbjct 241    CTCTTTTTTCCCGTACACGGGCGATGCCTTTTTTTTTTGCATCCGCGGGTATACGTACG 300

Query 301    TCGGCCTGTATGTACAATAGAAGGTGGGTATATCGTTTCCTTCATATGGCCATTCTGCCC 360
|
|
|
Sbjct 301    TCGGCCTGTATGTACAATAGAAGGTGGGTATATCGTTTCCTTCATATGGCCATTCTGCCC 360

Query 361    TTCTACATTTTGTGGGGGTCTACCGAAGCACTTCTCAGAATCCTACTGTATAAAATTAT 420
|
|
|
Sbjct 361    TTCTACATTTTGTGGGGGTCTACCGAAGCACTTCTCAGAATCCTACTGTATAAAATTAT 420

Query 421    TTCGAATCAAAGCCCTAAGCCTCTCGTATGCTTCTTCTAGTTACTCTCATAGTCTCATTG 480
|
|
|
Sbjct 421    TTCGAATCAAAGCCCTAAGCCTCTCGTATGCTTCTTCTAGTTACTCTCATAGTCTCATTG 480

Query 481    TCGTTACATGCCGACACTTTGGATCTTCCATCCTCTTAAGCAAACAATACTACCATTTTT 540
|
|
|
Sbjct 481    TCGTTACATGCCGACACTTTGGATCTTCCATCCTCTTAAGCAAACAATACTACCATTTTT 540

Query 541    GCAAGAGAAAAGAAGGATCGGATATTTCCGGGGAATCATCTTCTTCCCGGACAAGGACGA 600
|
|
|
Sbjct 541    GCAAGAGAAAAGAAGGATCGGATATTTCCGGGGAATCATCTTCTTCCCGGACAAGGACGA 600

Query 601    ATGAGCTGGGACGTGGCGACCCGGACGCGCCACTGGCTTCAGAGGCCCGGCCCCCTAGT 660
|
|
|
Sbjct 601    ATGAGCTGGGACGTGGCGACCCGGACGCGCCACTGGCTTCAGAGGCCCGGCCCCCTAGT 660

Query 661    CGGCAGCCACCTGCCGACCACTGATGCGACCACACGTAGCTCCCAGCCGCGGCGATTTCGT 720
|
|
|
Sbjct 661    CGGCAGCCACCTGCCGACCACTGATGCGACCACACGTAGCTCCCAGCCGCGGCGATTTCGT 720

Query 721    CCATCTGACCAGCCCTCTTTATGGGCTAGTCGGCACTCACCTGCCCATCCACTCACGAGC 780
|
|
|
Sbjct 721    CCATCTGACCAGCCCTCTTTATGGGCTAGTCGGCACTCACCTGCCCATCCACTCACGAGC 780

```

```

Query 781  GCGCACGTCGTGGTTTCGTATACCCTCCAACGGCCTATAAATACTGCGTCGCGCTGCATAT 840
          |
Sbjct 781  GCGCACGTCGTGGTTTCGTATACCCTCCAACGGCCTATAAATACTGCGTCGCGCTGCATAT 840

Query 841  GCTTTACACAACCACCTGCTTC 862
          |
Sbjct 841  GCTTTACACAACCACCTGCTTC 862

```

## Hsp82B

Alignment der publizierten Sequenz (Query) des Promotors Hsp82B mit der PCR-amplifizierten Sequenz (Sbjct). In der amplifizierten Sequenz sind drei Punktmutationen enthalten: T667G, T804C und C905T.

```

Query 1    TCTAGATTGTAATAAATGTTTGGTTCCAAATTAGTTTTGCTGACCAACGAACCTAGGCCG 60
          |
Sbjct 1    TCTAGATTGTAATAAATGTTTGGTTCCAAATTAGTTTTGCTGACCAACGAACCTAGGCCG 60

Query 61   TGTTCTTTGCAATACTATTCCAACCTCAATAACTCATAACTCATTTGTCACACGCACATT 120
          |
Sbjct 61   TGTTCTTTGCAATACTATTCCAACCTCAATAACTCATAACTCATTTGTCACACGCACATT 113

Query 121  TCTCAAACATCAAAACGTAATTTGTTTCTATGAAGTTTGATAAAAAATATTGTTTTAAAAA 180
          |
Sbjct 114  TCTCAAACATCAAAACGTAATTTGTTTCTATGAAGTTTGATAAAAAATATTGTTTTAAAAA 173

Query 181  TCATATTAATATGTATATATATATATATATAAAGTTTTTTAATTGATACTTAATTAA 240
          |
Sbjct 174  TCATATTAATATGTATATATATATATATAAAGTTTTTTAATTGATACTTAATTAA 231

Query 241  TCGTGTCAATAGGTTGTTTTGTTTTGCGTGTTACGAGGAAAGGCTTCCAACCTTAACCAA 300
          |
Sbjct 232  TCGTGTCAATAGGTTGTTTTGTTTTGCGTGTTACGAGGAAAGGCTTCCAACCTTAACCAA 291

Query 301  ATAACATAACCCTAAAGATAAAGACCACAAGTCTTCATTCGCTTCCAGAACCTTCTTGCA 360
          |
Sbjct 292  ATAACATAACCCTAAAGATAAAGACCACAAGTCTTCATTCGCTTCCAGAACCTTCTTGCA 351

Query 361  TCTAATCTGCGATGTGCAGTTGAACCTTCCAAAATTCATCCTGTAATTAAGTTGAACCTT 420
          |
Sbjct 352  TCTAATCTGCGATGTGCAGTTGAACCTTCCAAAATTCATCCTGTAATTAAGTTGAACCTT 411

Query 421  CTTGCATCTAATTTGCGATTTTTTCTATTTTGCAAAGATGCTATTCGAATGACAGTTTTA 480
          |
Sbjct 412  CTTGCATCTAATTTGCGATTTTTTCTATTTTGCAAAGATGCTATTCGAATGACAGTTTTA 471

Query 481  GTGATATTTTTGTAATTTTTTCAGTGGCAGTTTTACAATAACGATTTAAAGCAGTGGTAAA 540
          |
Sbjct 472  GTGATATTTTTGTAATTTTTTCAGTGGCAGTTTTACAATAACGATTTAAAGCAGTGGTAAA 531

Query 541  TTTATAATTGCCCTTACAAGAATTATAGTATTCACTATTCACATACAGTACTAGACCAT 600
          |
Sbjct 532  TTTATAATTGCCCTTACAAGAATTATAGTATTCACTATTCACATACAGTACTAGACCAT 591

Query 601  AGAGATGATGGTTTTCTTAATTTAAACCGACTCCAAGCCTCTCCACTCCTCCAGAACCTT 660
          |
Sbjct 592  AGAGATGATGGTTTTCTTAATTTAAACCGACTCCAAGCCTCTCCACTCCTCCAGAACCTT 651

```

---

```

Query 661 CCAAAATATAAAAACCATAACCAACCGACTGACATGTGGGCCCCGACGACTCGTCAAGTCG 720
        ||||| |
Sbjct 652 CCAAAAGATAAAAACCATAACCAACCGACTGACATGTGGGCCCCGACGACTCGTCAAGTCG 711

Query 721 TCCATCTCCCAACTCCCCCGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTAGAACGTTTCGAGAACCCCCATC 780
        ||||| |
Sbjct 712 TCCATCTCCCAACTCCCCCGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTAGAACGTTTCGAGAACCCCCATC 771

Query 781 TCCCCCTTATATATCGCCCCCTTTTTCCCCATCTTTCTCCAATCGAATCGCACACGCCAC 840
        ||||| |
Sbjct 772 TCCCCCTTATATATCGCCCCCTTCTTCCCCATCTTTCTCCAATCGAATCGCACACGCCAC 831

Query 841 GCGAGCTCCCTCTCCTAAAGCCCTAACCCCTAGCCTCCAAGTCGTCGTCTCCGGAAGCTT 900
        ||||| |
Sbjct 832 GCGAGCTCCCTCTCCTAAAGCCCTAACCCCTAGCCTCCAAGTCGTCGTCTCCGGAAGCTT 891

Query 901 CCGGCCTCCGCCGCCGCCGCAGCGCC 926
        |||| |
Sbjct 892 CCGGTCTCCGCCGCCGCCGCAGCGCC 917

```

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit enthält die Ergebnisse von Experimenten, die in der Zeit vom 20.10.2005 bis 30.08.2008 im

- Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Institut für Forstgenetik in Großhansdorf unter Anleitung von Dr. Matthias Fladung und im

- Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten des Departments Biologie der MIN-Fakultät der Universität Hamburg unter Anleitung von Dr. Dirk Becker durchgeführt wurden.

Ihnen gilt mein besonderer Dank, sowohl für die Ermöglichung der Dissertation als auch für die fachliche Betreuung während meiner Arbeit.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Lörz danke ich für die Übernahme der Schirmherrschaft, sowie Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für die Begutachtung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen und Mithelfern für die freundliche Arbeitsatmosphäre und für die hilfreiche Unterstützung bedanken, namentlich bei:

Simone Amati, Dr. Linus Kosambo Ayoo, Dr. Maram Bader, Bärbel Hagemann, Magarete Hunt, Dr. Oliver Klotzsche, Kerstin Kollek, Eva-Marina Kuhnst, Dr. Stephanie Meyer, Sabina Miaskowska, Dr. Nicole Mielke, Marlis Nissen, Olaf Nowitzki, Ursula Reinitz, Inga Röwer, Nanette Schlatermund, Dr. Stefan Scholten und Petra von Wiegen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Freunden und Sven Dierke bedanken, die mich in den gestressten Momenten immer unterstützt haben und ohne deren Beistand diese Arbeit so wohl nicht möglich gewesen wäre.

Für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Verbundprojektes zur „Optimierung der biologischen Sicherheit transgener Pflanzen“ danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.