

Zusammenfassung

Die Untersuchung von Mutanten mit einem erkennbaren Phänotyp ist ein klassischer Ansatz zur Isolierung von Genen und zur Bestimmung der Funktion von Genprodukten. Eine systematische Analyse von knock-out Mutanten in Hefe hat allerdings zu der Erkenntnis geführt, dass ein signifikanter Teil von Mutationen in keinem sichtbaren Phänotyp resultiert.

Die Identifizierung von funktional redundanten Genen und Genen, deren Produkte in mehreren Entwicklungsstadien gebraucht werden, ist besonders schwierig. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Technologien entwickelt, welche die Identifizierung solcher Gene erlauben. Die verbindende Komponente all dieser Systeme ist die Integration von Reporter-gen-Konstrukten in das zu untersuchende Genom. Die Expression des Reporter-gens hängt hierbei von der Transkription des chromosomalen Gens ab, in welches das Reporter-gen-Konstrukt integriert ist.

Die Identifizierung eines Gens erfolgt somit auf der Basis seines Expressionsmusters. Spezielle Konstruktionsmerkmale der Reporter-gen-Konstrukte sollen für die Expression des Reporter-enzym sorgen. Upstream eines promotorlosen Reporter-gens befindet sich eine dreifache Spleißakzeptorsequenz (3A-Site), die so konstruiert ist, dass eine translationale Fusion des Reporters in jedem der drei möglichen Leserahmen mit dem Produkt des Gens erfolgen kann, in das das Konstrukt integriert ist. Weitere wichtige *cis*-Elemente upstream des Reporter-gens sind Intronsequenzen, die die Verzweigungsstelle und die optimale DNA-Sequenzumgebung für ein effektives Spleißen liefern. Eine Spleißdonorsequenz upstream dieser Sequenzen, ermöglicht die Bildung des Wirtsgenprodukts::Reporter Fusion bei Integration des Konstruktes in ein Exon des Gens.

Zur effizienten Umsetzung dieser Technologie wurden modifizierte Transposons, so genannte *Gene-Trap* Elemente, entwickelt. Zur Insertionsmutagenese mit diesen Elementen werden meistens zwei Komponenten Systeme eingesetzt, die aus dem Transposase-abhängigen *Gene-Trap* Element und einem Transposase-exprimierenden Element bestehen. Liegen beide Elemente in einer Zelle vor, transponiert das *Gene-Trap* Element in neue Positionen im Genom.

Das *Gene-Trap* Element wird in der genomischen Position stabilisiert, indem die Transposase aus dem genetischen Hintergrund entfernt wird.

Die Effizienz eines *Gene-Trap* Systems hängt wesentlich von der erfolgreichen Bildung des Reporters ab. Hier ist entscheidend, dass eine translationale Fusion zwischen dem Produkt des Transposon-markierten Gens und dem Reporter gebildet wird. Der grundlegende Prozess hierfür ist eine effiziente Nutzung jeder der drei Spleißstellen in der 3A-Site. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein *Gene-Trap* Element zu entwickeln, dessen Strukturelemente derart optimiert sind, dass sie ein effizientes Spleißen über alle drei Spleißakzeptorstellen in monokotylen Pflanzen erlauben.

Das *Gene-Trap* Element ist ein Transposase-abhängiges Element auf der Basis des *Ac*-Transposons aus Mais und enthält somit die *cis*-aktiven Sequenzen, die zur Transposition benötigt werden. In diesen *Ac*-Sequenzen befinden sich upstream des verwendeten GUS Reporters vier putative Spleißdonorstellen.

In einem vorher entwickelten *Gene-Trap* Element *GTDs A (Gene-Trap Ds)*, wurden die notwendigen *cis*-Strukturelemente durch eine Intronsequenz eines monokotylen Gens mit einer künstlichen 3A-Site upstream eines Reporter-gens bereitgestellt. Erste Untersuchungen zur Funktion dieses Elementes zeigten ein erhebliches Potential für eine weitere Verbesserung der Nutzung der

3A-Site. Dafür wurden in dem hier entwickelten *Gene-Trap* Element *GTDs B* mehrere am Spleißprozeß beteiligte strukturelle Elemente modifiziert. Dazu gehörte die Bereitstellung einer Sequenz-optimierten Verzweigungsstelle im richtigen Abstand upstream der 3A-Site, sowie eine Optimierung des T-Stretch es zwischen Verzweigungsstelle und 3A-Site. Der Abstand der drei Spleißstellen der 3A-Site zueinander wurde im Vergleich zu *GTDs A* verringert und die Sequenz der ersten Spleißakzeptorstelle modifiziert.

Zur Untersuchung der Spleißvorgänge wurden *GTDs A* und *GTDs B* in Testerplasmide kloniert, welche die Integration von *GTDs* in Intron- oder Exonsequenzen eines Gens simulieren sollen. Eine Untersuchung der Nutzung jeder einzelnen Spleißakzeptorstelle der 3A-Site über einen Nachweis von GUS-Expression zeigte eine 32 mal bessere Erkennung der 3A-Site in *GTDs B*. In *GTDs B* werden die Spleißakzeptorstellen A2 und A3 im Gegensatz zu *GTDs A* effizient genutzt. Die Präferenz der Nutzung lag allerdings bei beiden Elementen bei der Akzeptorstelle A1.

Die Untersuchung der Nutzung der Spleißdonorstellen in den *Ac*-Sequenzen in Kombination mit der 3A-Site, zeigte für beide Elemente eine Nutzung der Donorspleißstellen D1,D3 und D4 in Kombination mit jeder der Akzeptorspleißstellen. Eine Präferenz lag bei der Nutzung der Kombinationen D1A1 und D3A1. Damit werden in *GTDs A* und *GTDs B* Spleißprodukte unter Nutzung sämtlicher Spleißakzeptorstellen der 3A-Site gebildet. Jeder Leserahmen wird durch mindestens zwei Spleißvarianten repräsentiert, die beiden präferentiell gebildeten Produkte decken zwei der drei Leserahmen ab.

Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass die *cis*-aktiven Sequenzen, die ein effizientes Spleißen vom Reporter an das endogene Gen ermöglichen, in *GTDs B* stringenter erkannt und somit effizienter genutzt werden als in *GTDs A*.

Drei verschiedene Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise auf eine Transposition des *GTDs A* Elementes in Gerste. Es konnten so genannte „Footprints“ nachgewiesen werden, die bei einer Exzision von *GTDs* aus dem zur Transformation verwendeten Konstrukt entstehen. Des weiteren konnten F2-Pflanzen identifiziert werden, die in einer Southern-Blot Analyse neue Element-spezifische Hybridisierungsmuster zeigen, die durch eine Transposition von *GTDs A* erklärt werden können. Außerdem deutet der Nachweis von GUS Aktivität in F3-Keimlingen einer ersten *Gene-Trap* Population auf eine Transposition von *GTDs A* in transkribierte Gensequenzen hin. Hier konnten von insgesamt 1592 untersuchten Individuen 19 Keimlinge mit GUS Expression in verschiedenen Geweben identifiziert werden. Damit wurde nicht nur gezeigt, dass *GTDs A* in Gerste transponiert, sondern auch, dass es in einem *Gene-Trap* System zur Identifizierung von Genexpressionsmustern eingesetzt werden kann.