

**Entwicklung einer Methode zur Rekombinase
basierten Eliminierung von Transgenen in Mais
(*Zea mays* L.) Keimzellen**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Axel Hinze aus Bremerhaven

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. U. WIENAND
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Prof. Dr. J. KEHR
Tag der Disputation: 17. Mai 2013

Hamburg, den 30. April 2013

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'L' followed by a horizontal line.

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Biotechnologie der Pflanzen.....	8
1.2 Koexistenz und Confinement von gentechnisch veränderten Pflanzen	10
1.3 Rekombinasen	13
1.4 Rekombinase basierende Confinement Systeme.....	16
1.5 Konstruktdesign und Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Biologische Materialien	20
2.1.1 Pflanzenmaterial	20
2.1.2 Bakterienstämme.....	20
2.1.3 Plasmide	21
2.1.3.1 pJet1.2.....	21
2.1.3.2 pD1-Ubi-FL-Bar-LF-GFP	21
2.1.3.3 pD1-Ubi-L-GFP.....	22
2.1.3.4 pUbi-FLP.....	22
2.1.3.5 pUbi-FLPo.....	22
2.1.3.6 pUbi-FLPoi	22
2.1.3.7 pPollenEx1.....	23
2.1.3.8 pPollenEx2.....	24
2.1.3 Oligonukleotide.....	26
2.1.4 Antikörper	28
2.1.5 Medien	28
2.1.5.1 Grundmedien für die Transformation von Mais.....	29
2.1.5.2 Medien für die Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais	30

2.2 Methoden	31
2.2.1 Arbeiten mit Pflanzenmaterial.....	31
2.2.1.1 Embryo Rescue.....	31
2.2.1.2 Transformationsmethoden.....	31
2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten.....	33
2.2.2.1 Aufarbeiten von Pflanzenmaterial.....	35
2.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	35
2.2.2.3 Southern Blot	35
2.2.2.4 Nachweis der Expression der Cre Rekombinase mittels RT-PCR.....	37
2.2.2.5 Nachweis der Cre Rekombinase mittels Western Blot.....	37
2.2.2.6 Inverse PCR zur Integrationsortbestimmung.....	38
2.2.3 Histochemischer β -Glucuronidase Test	39
2.2.4 Hitzeaktivierung der Konstrukte in Keimlingen	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Vorarbeiten.....	40
3.1.1 Kodonoptimierung der FLP Rekombinase	40
3.1.2 Die Vektoren pPollenEx1 und pPollenEx2	44
3.1.3 Integration des postulierten PME1 –Promotorsequenz.....	46
3.2 Agrobakterien vermittelte Transformation von <i>Zea mays</i>	47
3.2.1 Transformationssystem von unreifen Maisembryonen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	47
3.2.2 Molekulare Analyse der T ₀ -Generation	50
3.3 Etablierung eines Systems zur Aktivierung der Konstrukte mittels Hitzeschock	52
3.3.1 Nachweis der hitzeinduzierten Transkription der Cre-Rekombinase.....	53
3.3.2 Nachweis der hitzeinduzierten Translation der Cre Rekombinase	55
3.3.3 Nachweis der hitzeinduzierten Rekombination der Konstrukte	57

3.4 Analyse der Auskreuzungsversuche aktivierter Pflanzenlinien.....	62
3.4.1 Zusammenfassung der Auskreuzungsversuche.....	68
3.5 Molekulare Analysen der Rekombination in T ₂ -Pflanzen.....	68
3.5.1 Nachweis der zweiten Rekombination mittels PCR.....	69
3.6 Nachweis der Rekombination am Integrationsort in der genomischen DNA	71
3.6.1 Ermittlung des Integrationsortes der T-DNA im Genom mittels inverser PCR.....	71
3.6.2 Validierung des Integrationsortes und dessen Stabilität während der Rekombination.....	75
3.6.2.1 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440	75
3.6.2.2 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711	79
3.6.2.3 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3715	80
3.6.2.4 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3735	81
4. Diskussion.....	84
4.1. Aufbau und Funktionsweise der Konstrukte	84
4.2 Adaptation der FLP Rekombinase	86
4.3 Hitzeschockaktivierung der Konstrukte.....	89
4.3.1 Ermittlung der Aktivierungsbedingungen des Promotors GmHSP17.5E.....	90
4.4 Gewebespezifische Expression der zweiten Rekombinase	96
4.5 Auskreuzungsversuche	97
4.6 Integrationsortbestimmung	101
4.6.1 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440	103
4.6.2 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711	106
4.6.3 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3735	108
4.6.4 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3715	111
4.7 Fazit und Ausblick	113
5. Literaturverzeichnis.....	115

Abkürzungsverzeichnis.....	131
Anhang	134
Danksagung	137
Eidesstattliche Versicherung.....	138

Zusammenfassung

Seit dem ersten kommerziellen Anbau von transgenen Pflanzen im Jahre 1996 haben sich die hierfür genutzten Anbauflächen mit einem jährlichen Zuwachs von 5-10 % kontinuierlich vergrößert. Besonders der Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen in wichtigen Grundnahrungs- und Futterpflanzen wie Mais, Soja oder Raps führte zu Schwierigkeiten mit der konventionellen Landwirtschaft. Dabei besteht ein hohes Risiko durch die unkontrollierbare Verbreitung von Pollen gentechnisch veränderter Pflanzen auf konventionelle Pflanzen und damit der unkontrollierten Auskreuzung transgener Sequenzen in nicht-transgene Nutz- und Wildpflanzen. Um eine Koexistenz, von transgenen und nicht-transgenen Nutzpflanzen zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit versucht, eine neuartige Confinement Methode zu etablieren, die das Ziel hatte, eine unkontrollierte Ausbreitung von transgenen Eigenschaften in die Umwelt entweder über den Pollen oder sämtliche generativen Zellen zu unterbinden. Gleichzeitig sollte es mit diesem transgenen Ansatz möglich sein, auch homozygoten Saatgut durch Züchtung zu erzeugen.

Hierfür wurden Konstrukte entwickelt, die durch den Einsatz von zwei gekoppelten Rekombinasesystemen in einem inaktivierten Zustand in der Pflanze vorliegen und erst nach der Applikation eines speziellen Reizes eine Weitergabe der transgenen Eigenschaften in die nächste Generation verhindern. Dabei wurden die Rekombinasesysteme *Cre/loxP* aus dem Bakteriophagen P1 und *FLP/FRT* aus der Hefe eingesetzt, deren Effizienz in der Entfernung von Markergenen schon gezeigt werden konnte. Während die Effektivität der Cre Rekombinase in Mais schon bekannt war, musste die FLP Rekombinase durch eine Kodonoptimierung der Sequenz verbessert werden, bevor sie für die Anwendung im Mais eingesetzt werden konnte. Die spezifische Aktivierung der Konstrukte wurde durch den Hitzeschock induzierten Promotor *GmHSP17.5E* aus der Sojabohne gewährleistet. In Konstrukten, die eine Ausbreitung transgener Eigenschaften allein über den Pollen verhindern sollten (*pPollenEx1* und *pPollenEx2*), wurde die gewebespezifische Exzision durch den pollenspezifischen *ZmMADS2* Promotor aus Mais reguliert. Für eine Eindämmung der transgenen Eigenschaften in sämtlichen generativen Zellen wurden die Promotorsequenzen *ZmPMEI* und *ZmPMEI-5'UTR* aus Mais eingesetzt (*pGermlineEx1* und *pGermlineEx2*).

Durch Agrobakterien-vermittelte Transformation von Maisembryonen mit den vier unterschiedlichen Konstrukten wurden insgesamt 398 Maislinien erstellt und auf Einzelintegrationen der T-DNA hin analysiert. Nach der Etablierung der Aktivierungsbedingungen wurde mit insgesamt 54 Linien eine Hitzeschockaktivierung durchgeführt, nach der in 39 Linien eine vollständige Aktivierung der Konstrukte nachgewiesen werden konnte. Dabei kommt es zur Neuverknüpfung des jeweiligen Keimbahn-spezifischen Promotors (ZmMADS2 bzw. PME1) mit der zweiten Rekombinase, die ihrerseits während der Keimzellenbildung aktiviert wird und sämtliche Protein-codierenden und regulatorischen Sequenzen aus den Zellen entfernt. Bei den folgenden Auskreuzungsversuchen, zwischen transgenen Pollenspendern bzw. Empfängern mit nicht-transgenen Maispflanzen konnte in fünf von 34 Linien eine vollständige Eliminierung der transgenen Sequenzen in den Nachkommen aus den Auskreuzungen beobachtet werden. Die erfolgreiche sequenzgenaue Exzision der Konstrukte durch die jeweilige zweite Rekombinase konnte auf molekularer Ebene bestätigt werden. Zusätzlich konnte für drei Linien eine genaue Analyse des Integrationsortes durchgeführt werden. Hierbei wurde die Stabilität des Integrationsortes während der Rekombinationen und der Vererbung gezeigt.

In dem hier vorgestellten Ansatz konnte eine völlig neuartige Confinement Methode etabliert werden, bei der es, durch die Verwendung zweier Rekombinationssysteme und deren induzierter und gewebespezifischer Expression, zur kompletten Eliminierung transgener Sequenzen aus den reproduktiven Zellen kommt. Damit wurde ein wichtiger methodischer Ansatz für eine mögliche Koexistenz von transgenen und konventionellen Nutzpflanzen unter Feldbedingungen etabliert.

1. Einleitung

Den Übergang zum Neolithikum vor etwa 14 000 bis 10 000 Jahren kann man auch durch den Wechsel von einer aneignenden hin zu einer produzierenden Wirtschaftsweise, also von einer mobilen Jäger- und Sammlergesellschaft zu einer sesshaften Ackerbau- und Viehzuchtgesellschaft definieren. Erst die durch den Ackerbau bedingte hohe Nahrungsdichte, sowie die ganzjährige Vorratshaltung, ermöglichte eine Spezialisierung der Menschheit (Zeder, 2008). Nach der einfachen Kultivierung von Pflanzen folgte die Domestizierung von wenigen 100 verschiedenen Pflanzenarten, zunächst durch primitive Auslese. Die Feststellung, dass die unterschiedlichen Arten ein Produkt ihrer eigenen Variabilität und der Selektion des Züchters sind (Charles Darwin, 1868), sowie die Versuche von Gregor Mendel, führten zu der gezielten Kombinationszüchtung, die versuchte, bestimmte Eigenschaften zu erhalten oder in die Pflanzen einzubringen (Novak und Brunner, 1992). Erste Versuche die natürliche Varianz künstlich zu erhöhen, wurden in den 1920er Jahren sowohl an Mais und Gerste, als auch an *Drosophila* mittels Bestrahlung durchgeführt (Mba et al. 2010). Neben hochenergetischer Strahlung wurden auch vielfach Chemikalien für die Induktion von genetischen Mutationen eingesetzt (Hoffmann, 1980). Während die Züchtung einer neuen Pflanzensorte allein aufgrund von phänotypischen Eigenschaften einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren beansprucht, führt die Etablierung von genetischen Markern zu einer deutlichen Beschleunigung dieses Prozesses (Saedler und Schuchert, 2001). Besonders die Umgehung von aufwändigen und großangelegten Feldversuchen durch die Entwicklung von Zell- und Gewebekulturen führte zu einer kostengünstigeren und schnelleren Produktion von neuen Sorten. Darüber hinaus war es nun möglich, erfolgreiche Züchtungen mit Pflanzen durchzuführen, die sich in klassischen Ansätzen als unhandlich erwiesen haben, wie zum Beispiel Bananen oder Kakao (Nowak und Brunner, 1992). Um neue Eigenschaften oder Resistenzen von Wildarten in bestehende Saatgutlinien einzubringen, müssen aufwendige Rückkreuzungen durchgeführt werden. Auch bei dem Versuch neue Eigenschaften mittels Mutagenese in Pflanzenlinien zu etablieren, ist ein nicht unerheblicher züchterischer Aufwand, sowie intensive molekulare und physiologische Analysen notwendig (Moose und Mumm 2008). Beide Methoden haben den großen Nachteil, dass die Veränderungen im Genom zufällig und ungerichtet sind, da entweder eine hohe Anzahl an neuen Genen eingekreuzt werden oder eine Vielzahl von zufälligen

Mutationen über das gesamte Genom verteilt sind. Diese großen Veränderungen in der genetischen Zusammensetzung des Genoms können aber auch zu ungewollten Veränderungen führen. So wurde bei der Züchtung der Kartoffelsorten Lenape und Magnum Bonum versehentlich der hohe Alkaloidgehalt der Wildkartoffel wieder hergestellt (www.biosicherheit.de/aktuell/150.tilling-alternative-gentechnik.html).

1.1 Biotechnologie der Pflanzen

Während die klassische Züchtung von Pflanzen durch umfassende Neukombinationen und die Analyse von genetischen Markern versucht, möglichst viele positive Eigenschaften in Saatgutlinien zu vereinen, ist die Biotechnologie in der Lage, gezielt neue genetische Informationen in Pflanzen zu integrieren. Über Artgrenzen hinweg können neue physiologische Eigenschaften aus völlig fremden Organismen gezielt in Pflanzen eingebracht werden. Auf der anderen Seite ist es durch das gezielte Auslösen von RNAi Mechanismen möglich, gezielt Gene in Organismen auszuschalten (Fire et al. 1998). Darüber hinaus konnte, zum Beispiel durch Vergleiche der genomischen Information der α -, ω -, und γ -Gliadin Genfamilie, in Weizen mit Hilfe eine 361 bp großen hochkonservierten Sequenzabschnitten ein RNAi Effekt auf die ganze Genfamilie übertragen werden (Gil-Humanes et al. 2010).

Zu den grundlegendsten Veränderungen in der modernen Landwirtschaft hat die Adaptation von natürlich vorkommenden Resistenz- und Abwehrmechanismen in einer breiten Palette von Nutzpflanzen geführt. In diesen sogenannten transgenen Pflanzen der ersten Generation wurden Gene aus diversen Organismen integriert, die in der Pflanze zur einer Produktion von Insektiziden oder zu einer Resistenz gegen bestimmte Breitbandherbizide führen.

Durch den Einsatz von hocheffektiven geringtoxischen Herbiziden konnte, gepaart mit guter landwirtschaftlicher Praxis, eine Verringerung der Kosten und des Arbeitsaufwandes, aber auch eine deutliche Reduktion der ausgebrachten Herbizidmenge im Vergleich zur konventionellen Landwirtschaft nachgewiesen werden (Brookes und Barfoot, 2010). Besonders der Einsatz von Kulturpflanzen mit integriertem Insektenschutz, ausschließlich vermittelt durch sogenannte Bt-Toxine von verschiedenen Stämmen des grampositiven Bakteriums *Bacillus thuringiensis* (Crickmore et al. 1998, Höfte und Whitley 1989) , zeigte einen drastischen Rückgang in der Verwendung von toxischen Chemikalien und die durch

unsachgemäßen Umgang verursachten Vergiftungen. Darüber hinaus war es den Landwirten möglich, mit transgenen Pflanzen, im Vergleich zu konventionellen Linien, einen deutlich höheren Ertrag zu erwirtschaften (Qaim und Zilberman, 2003; Huang et al 2005). Diese Vorteile führten besonders bei Kleinbauern in den Entwicklungsländern zu einer sehr schnellen Annahme des neuen Saatguts. Seit Beginn der Kommerzialisierung von transgenen Pflanzen im Jahre 1996 haben sich die Anbauflächen von transgenen Pflanzen jährlich um etwa 10 Millionen Hektar vergrößert, wobei 2012 erstmals mehr Anbauflächen in Entwicklungsländern als in den Industriestaaten zu finden sind (Abb.1, James, 2012). Während die Möglichkeiten des Gentransfers auch für die Forschung von großer Bedeutung ist, hat die `Grüne Biotechnologie` eine breite Palette an Pflanzen der zweiten Generation hervorgebracht, die neue Eigenschaften besitzen. Diese reichen von neuen Farben für Zuchtblumen (Moonseries™, Florigene Pty Ltd., Australien) über mit Vitaminen angereicherten Mais (Naqvi et al. 2009) bis hin zu verzögerter Seneszenz bei Melonen (Melon A, Agritope Inc., USA) und einem veränderten Stärkegehalt in Kartoffeln für industrielle Anwendungen (Amflora, BASF Plant Science, Deutschland). Eine neue dritte Generation von transgenen Pflanzen ist in der Entwicklung, deren Eigenschaften sowohl über Toleranzen gegen versalzete Böden, Trockenheit oder Kälte bis hin zur Produktion von Pharmazeutika reicht (The European Union Framework 6 Pharma–Planta Consortium 2005 und TAB-Arbeitsbericht Nr.104). Es ist Forschern gelungen, transgenen Reis herzustellen, in dem bis zu 10 % des löslichen Proteins im Korn rekombinantes Humanalbumin ist, dessen medizinische Wirksamkeit in Ratten bestätigt werden konnte (He et al. 2011).

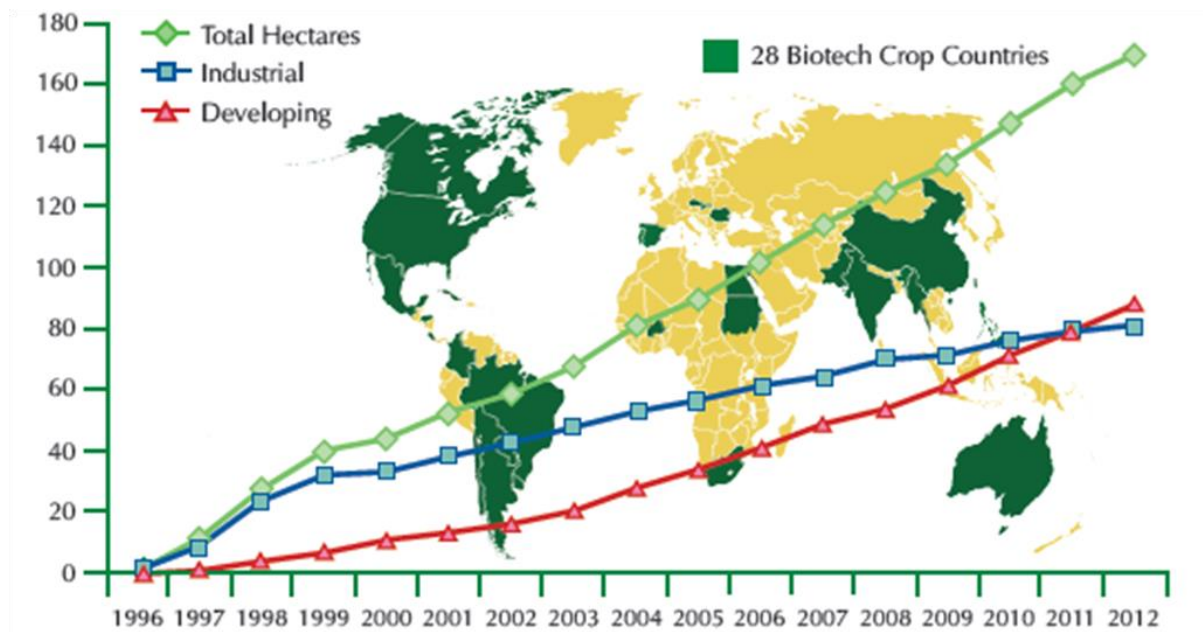


Abbildung 1: Übersicht der weltweiten Ausbreitung von Anbauflächen mit transgenen Pflanzen

Die Graphik zeigt die jährliche Entwicklung der Anbauflächen mit transgenen Pflanzen. Länder, in denen transgene Pflanzen angebaut werden sind grün unterlegt. Auf der X-Achse sind die Jahre 1996 bis 2012 dargestellt, während auf der Y-Achse die Anbauflächen in Millionen Hektar angegeben ist. Die jährliche Entwicklung der Gesamtanbaufläche (grüne Linie) ist zusätzlich dargestellt als Anbauflächen in Industrieländern (blaue Linie) und in Entwicklungsländern (rote Linie).

Quelle: James, 2010

1.2 Koexistenz und Confinement von gentechnisch veränderten Pflanzen

Die rapide Ausbreitung von gentechnisch veränderten Pflanzen mit immer neuen Eigenschaften und Kombinationen von Veränderungen brachte aber auch bedenkliche Aspekte mit sich. Während die neuartigen Eigenschaften vor ihrer Nutzung auf staatlicher Ebene intensiv auf ihre Auswirkungen auf den Menschen und die Umwelt getestet wurden und werden (EU-Richtlinie 2001/18/EG, Verordnung (EG) 1829/2003, Tyshko et al. 2007), bleibt als grundlegende Schwierigkeit die unkontrollierte Ausbreitung von neu erzeugten genetischen Sequenzen in die Umwelt, die eine fast unwiderrufliche Kontamination der Pflanzenwelt mit sich führen würde (Ellstrand 2003). Als Hauptursachen für die ungewollte Verbreitung von Transgenen in die Umwelt konnte Pollenflug, Saatverlust und Durchwuchs ermittelt werden (Beckie und Hall, 2008). Die Problematik der ungewollten Kontamination der Umwelt und der Persistenz von einmal freigesetzten Transgenen konnte von Quist und

Chapela (2001) insofern gezeigt werden, als in Landrassen von mexikanischem Mais Fragmente des 35S Promotors und des NOS- Terminators gefunden werden konnten. Obwohl die Methodik und Details dieser Studie nicht unumstritten waren (Cleveland et al. 2005, Ortiz-García et al. 2005, Snow, 2009), blieb die generelle Aussage der persistenten genetischen Kontamination bestehen. Obwohl bereits viele verschiedene Eindämmungsmethoden entwickelt wurden, wie zum Beispiel Plastidentransformation, Kleistogamie oder zytoplasmatische männliche Sterilität (CMS), weisen diese häufig eine große Variabilität ihrer Zuverlässigkeit auf und sind oft für die Züchtung von neuem Saatgut nicht geeignet (Hüsken et al. 2010, Lu, 2003). Durch Anbaumaßnahmen, wie zum Beispiel das Einbringen von Pufferzonen und Mantelsaaten könnte zwar die Ausbreitung von transgenem Pollen unter dem rechtlichen Grenzwert der Ausbreitung gehalten werden (Langhoff et al. 2011), weitere Untersuchungen konnten aber belegen, dass die Ausbreitung von transgenen Sequenzen durch die Verbreitung von Pollen auch deutlich über diesen etablierten Grenzen liegen kann (Mais: Ma et al. 2004; Bannert und Stamp, 2007; Raps: Rieger et al. 2002; Weizen: Matu-Cádiz, 2007; Baumwolle: Wegier et al. 2011).

Ein weiteres Problem von Pflanzen mit transgenen Eigenschaften stellen der Transport und die Lagerung dar. Einige Pflanzen mit gentechnischen Veränderungen sind nicht oder noch nicht für den menschlichen Verzehr, wohl aber für die Tierfütterung zugelassen. Eine Vermischung von transgenen und nicht transgenen Pflanzenprodukten, die erst zu spät bemerkt wird, kann dramatische Folgen haben. So wurde Mais der Sorte StarLink™ von Aventis Crop Science (heute Bayer Crop Science) aufgrund der Stabilität des eingesetzten Bt-Toxins Cry9C und des daraus resultierenden Allergierisiko 1998 in den USA explizit als nicht für den menschlichen Verzehr geeignet erklärt. Eine Nutzung war nur als Tierfutter oder zu industriellen Zwecken vorgesehen und in der Registrierung waren spezifische Voraussetzungen in der Handhabung eingefügt, die eine Vermischung mit Lebensmittelmais verhindern sollten. Trotz eines nur kleinflächigen Anbaus in den USA (unter 0,5 % der Maisanbauflächen) konnte im September 2000 Reste von StarLink™ Mais in Tacos nachgewiesen werden. Die letzten positiven Tests wurden noch 2003 durchgeführt, wobei auch 2007 noch Verunreinigungen am Rande der Nachweisbarkeit auftraten (http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/starlink_corn.htm). Dieses Beispiel zeigt, wie schwer es ist, eine Kontamination in den Liefer- und Lagerwegen auszuschließen und wie lange diese Kontamination noch nachweisbar wirksam ist. Die Verbreitung von

biotechnologisch veränderten Pflanzen der zweiten Generation, die nicht für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel geeignet sind, sondern Eigenschaften für industrielle oder medizinische Anwendungen enthalten können, stellen darüber hinaus eine besondere Gefahr für die Umwelt und die Lebensmittelproduktion dar. Bislang sind derartige Pflanzen noch nicht kommerzialisiert, aber einige Firmen betreiben damit intensive Feldversuche. Trotz genauer Sicherheitsvorschriften konnte in zwei Fällen im Jahr 2002 unter der Verantwortlichkeit von ProdiGene eine Kontamination der Umwelt mit gentechnisch verändertem Mais festgestellt werden, der nicht für den menschlichen Verzehr geeignet war. Zum einen konnte in Iowa eine Auskreuzung von Trypsin produzierendem Mais über den Pollen in benachbarte Felder nachgewiesen werden, deren Pflanzen daraufhin verbrannt werden mussten. Der weitaus schlimmere Fall bezog sich auf Durchwuchs von Avidin akkumulierenden Maispflanzen in einem Feld, das nach der Studie mit Soja bepflanzt wurde. Maissaatgut, das anscheinend bei der Ernte verloren gegangen war, wuchs auf dem neu angelegten Sojabohnenfeld und wurde trotz Hinweis eines APHIS Mitarbeiters (Animal and Plant Health Inspection Service, USA) nicht entfernt und zusammen mit den Sojabohnen geerntet. Die verhängte Strafe der USDA (US Department of Agriculture) betrug damals 250000 \$ sowie die Verpflichtung das kontaminierte Saatgut zurückzukaufen und verbrennen zu lassen. Dieses führte zu Folgekosten von etwa 3,5 Millionen \$ und machte die Firma ProdiGene beinahe zahlungsunfähig (Ellstrand, 2003 sowie Gilles, 2003).

Diese Beispiele zeigen die Notwendigkeit einer stetigen und gewissenhaften Kontrolle, aber auch, dass es einer neuen und zuverlässigen Methode bedarf, um Kontaminationen von Lebensmitteln und der Umwelt mit gentechnisch verändertem Material zu unterbinden.

Eine weitere Möglichkeit der genetischen Eindämmung ist die gezielte Entfernung von transgenen Sequenzen aus dem Wirtsgenom durch eine Rekombinase. Dieses Verfahren wurde schon oft im Labormaßstab für die Entfernung von Markergenen aus transgenen Pflanzen erprobt (Apfel: Herzog et al. 2012, Pappel: Fladung et al. 2010, Mais: Zhang et al. 2003, Tabak: Wang et al. 2005, Mlynárová et al. 2006 oder Bananen: Chong-Pérez et al. 2011).

1.3 Rekombinasen

Rekombinasen sind Proteine, die sowohl in Viren und Prokaryonten als auch in niederen Eukaryonten, wie zum Beispiel den Hefen, vorkommen. Im Gegensatz zu der homologen Rekombination von DNA benötigen Rekombinasen nur zwei kurze homologe Sequenzen als Erkennungssequenzen, der katalysierte Strangaustausch benötigt keine weitere DNA Synthese oder energieliefernde Kofaktoren. Die Energie aus der Spaltung der Phosphodiester Bindung wird durch eine Bindung an die Rekombinase konserviert und für die erneute Ligation genutzt (Argos et al. 1986). Die Rekombinasen spalten sich generell in zwei Gruppen, definiert durch die Aminosäure im aktiven Zentrum, die den Strangbruch in der DNA auslöst. Zum einen die Serin Rekombinasen, auch Resolvasen/Invertasen genannt, zum anderen die Tyrosin Rekombinasen, auch Integrasen genannt. Während die Serin Rekombinasen generell nur intramolekular Inversionen oder Exzisionen durchführen können, sind die Tyrosin Rekombinasen zusätzlich zu intermolekularer Integration in der Lage (Hallet und Sherratt, 1997). Für Anwendungen in der Biotechnologie, sowohl bei Bakterien, Tieren und Pflanzen, wurden häufig die Tyrosin Rekombinasesysteme *Cre/loxP* des Bakteriophagen P1 (Sternberg und Hamilton, 1981), *FLP/FRT* des 2 μ Plasmids aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Broach et al. 1982) oder *R/RS* des pSR1 Plasmids von *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. 1985) eingesetzt, obwohl eine Vielzahl weiterer ähnlicher Rekombinasesysteme beschrieben worden sind (*VCre/VloxP* und *SCre/SloxP*: Suzuki und Nakayama, 2011 sowie *KD*: Chen et al. 1986, *B2*: Utatsu et al. 1987, *B3*: Toh-e et al. 1985). Grundsätzlich erfüllen die mehr als 100 verschiedenen Integrasen eine Bandbreite an molekularen Funktionen. Sie vermitteln die Integration und Exzision von viraler DNA in das Wirtsgenom, die Auflösung von Replikon-Dimeren bei Bakterien, die Transposition, Mobilisierung von Genkassetten oder regulieren die Anzahl von Plasmiden in der Zelle (Chen und Rice, 2003).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Rekombinasesysteme *Cre/loxP* und *FLP/FRT* stammen zwar aus völlig unterschiedlichen Organismen (Bakteriophage P1 und Bäckerhefe), sind aber in einigen Aspekten extrem ähnlich. Obwohl die genetische Sequenz der Rekombinasen deutliche Variationen aufweisen (Stark et al. 1992) ist der Aufbau des aktiven Zentrums mit den Aminosäuren Tyrosin, Histidin und Arginin (Argos et al. 1986) stark konserviert. Auch der

grundsätzliche Aufbau der 34 bp minimalen Erkennungssequenzen ist im Vergleich zwischen FLP und Cre (aber auch VCre und SCre) gleich. Ein asymmetrisches Fragment von 8 bp, das der Erkennungssequenz eine Orientierung verleiht und in dem der Strangbruch stattfindet, ist umschlossen von zwei zueinander inversen 13 bp großen Fragmenten, die als Bindestelle für die Rekombinasen fungieren. Intensive Studien der Vorgänge während der Rekombination wurden durchgeführt (Übersicht: Ringrose et al. 1998), wobei festgestellt werden konnte, dass auch die Abläufe während einer Rekombination bei Cre/*loxP* und FLP/*FRT* gleich sind. Als erster Schritt binden einzelne Proteinmoleküle an die 13 bp großen Randsequenzen der Erkennungssequenzen.

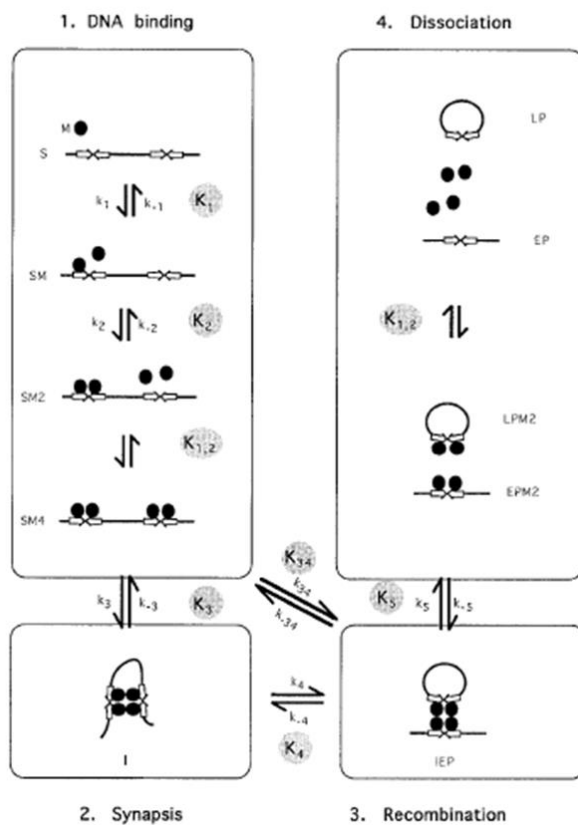


Abbildung 2: Schematischer Ablauf einer Exzision

Die erste Phase der Rekombination wird durch die Bindung der Rekombinasen an die Erkennungssequenzen definiert (Box 1. DNA binding). Hierbei binden an jede Erkennungssequenz zwei Rekombinasen, jeweils eine pro repetitive Sequenz. Nachdem alle vier potentiellen Bindestellen mit einer Rekombinase belegt ist, bildet sich durch Protein-Protein Interaktion ein synaptischer Komplex, genannt Holliday Junction (Box 2. Synapsis). In diesem findet die Rekombination durch Auftrennung und Neuverknüpfung der DNA Stränge statt (Box 3. Recombination). Nach der Rekombination löst sich der synaptische Komplex (Box 4. Dissociation) und, im Falle einer Exzision, löst sich ein ringförmiges Exzisionsfragment aus der DNA. Anschließend dissoziieren die Rekombinasen von ihren DNA Bindestellen und die Rekombination ist abgeschlossen. Schwarzer Kreis: Rekombinase; schwarzer Strich: DNA Molekül; offener weißer Pfeil: repetitive Sequenz

Quelle: Ringrose et al. 1998

Erst wenn jede der Randsequenzen ein Proteinmonomer trägt, kommt es zur Interaktion zwischen den beiden Protein-DNA-Dimeren. Durch Protein-Protein-Wechselwirkungen wird ein synaptischer Komplex gebildet, der aufgrund von Röntgenstrahlanalysen Holliday-Junction genannt wird. In diesem findet die Auftrennung und neue Verknüpfung der DNA Stränge statt (Abb.2, Ringrose et al. 1998). Die Ausrichtung des asymmetrischen Fragments zwischen den palindromischen Erkennungssequenzen bestimmt dabei, durch die Position

der DNA Spaltung, ob während der Rekombination eine Inversion (gegenläufige Orientierung) oder eine Exzision/Integration (parallele Orientierung) des zwischen den Rekombinationssequenzen liegenden Bereiches stattfindet. Während der Rekombination bildet sich aus den an die Erkennungssequenzen gebundenen Rekombinasen eine Tetramerstruktur (Holliday Junction, Abb.3: Chen und Rice, 2003). Über einen nukleophilen Angriff spalten die diagonal gegenüberliegenden Tyrosinreste in den aktiven Zentren jeweils einen DNA Strang, wobei die freiwerdende Energie aus der Trennung in einer stabilen DNA-Protein Bindung gespeichert wird. Durch Interaktion der beiden aktiven Rekombinasen wird das freie Ende des gegenüberliegenden Stranges zu der Tyrosin-DNA Bindung hin verlagert und die DNA-Enden neu verknüpft. Durch eine scherenartige Konformationsänderung des Tetramers werden die beiden anderen Rekombinasen aktiviert und führen erneut einen diagonal gegenüberliegenden Strangbruch gefolgt von einer Ligation durch (Chen und Rice, 2003). Danach dissoziiert der Komplex wieder.

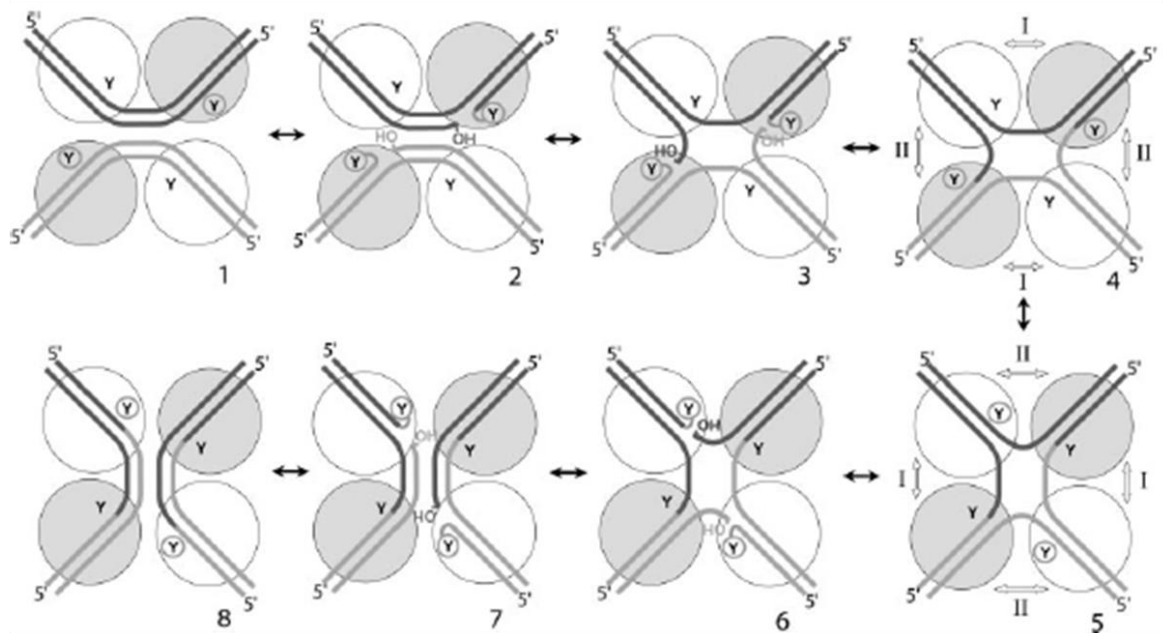


Abbildung 3: Rekombinatioinsmechanismus in der Holliday Junction

Nachdem die vier Rekombinasemonomere an die Erkennungssequenzen gebunden haben, bilden sie durch Protein-Protein Interaktion ein Tetramer, die sogenannte Holliday Junction (1). Jeweils ein Strang der Erkennungssequenzen wird durch einen nukleophilen Angriff der diagonal gegenüberliegenden Tyrosine im aktiven Zentrum an einer bestimmten Stelle des 8 bp asymmetrischen Fragments gespalten und kovalent an das Tyrosin gebunden (2). Durch elektrostatische Anziehung wird die freie OH-Gruppe zu dem gegenüber liegenden DNA-Protein-Heteromer geführt (3). Dort werden die beiden DNA-Enden mithilfe der energiereichen Tyrosin-DNA-Bindung wieder verknüpft (4). Durch eine Konformationsänderung in der Holliday Junction und der Aktivierung der beiden anderen Tyrosin-Reste (5) wird der zweite DNA Strang aufgetrennt (6), verlagert (7) und neu verknüpft (8). Die Rekombination ist damit abgeschlossen und der synaptische Komplex löst sich auf.

Quelle: Chen und Rice, 2003

1.4 Rekombinase basierende Confinement Systeme

Während die unkontrollierte Ausbreitung von transgenen Sequenzen in die Umwelt eines der Hauptprobleme der grünen Gentechnik darstellt (Ellstrand 2003, Lu 2007), musste besonders für den Mais festgestellt werden, dass dabei die Auskreuzung über den Pollen die Hauptursache hierfür darstellt (Becki and Hall 2008, Langhoff et al 2011). Ziel der Arbeit war es, ein Vektorsystem zu etablieren, das die Möglichkeit der Züchtung und Saatguterstellung beinhaltet, aber gleichzeitig transgene Sequenzen erfolgreich aus den Pollen oder den Keimbahnen entfernt.

In vorangegangenen Arbeiten konnte die Eliminierung von transgenen Sequenzen mittels Rekombination sowohl durch gewebespezifische als auch induzierte Expression der

Rekombinasen gezeigt werden. So konnten zum Beispiel Mlynárová und Mitarbeiter (2006) in Tabakpollen eine Autoexzision mit Hilfe des mikrosporenspezifischen Promotors NTM19 durchführen, wobei nur zwei Nachkommen aus insgesamt 16 800 Samen keine erfolgreiche Exzision zeigten. Aufgrund des hemizygoten Versuchsmaterials führt dies zu einer beeindruckenden Fehlerrate von 0,024 %. Ähnliche Ergebnisse (Arabidopsis: Verweire et al. 2007, Tabak: Luo et al. 2007) zeigen eine hohe Effektivität von gewebespezifischen Autoexzisionsansätzen. Diese Systeme sind aber nur anwendbar, wenn die Pflanzen nicht weiter gezüchtet werden müssen und über Ableger oder Stecklinge vermehrt werden können. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der gewebespezifischen Autoexzision ist die reine Entfernung von Markergenen nach der Transformation, wenn die grundlegenden transgenen Eigenschaften in der Pflanze erhalten bleiben sollen (Verweire et al. 2007).

Eine erfolgreiche Exzision von Markergenen konnte auch durch den Einsatz von induzierbaren Promotoren ausgelöst werden. Hierbei wurden verschiedene Kombinationen von Promotoren in diversen Pflanzen getestet. Yuan und Mitarbeiter (2004) konnten in Tabak mit dem Promotor In5-2 aus Mais nach der Induktion durch ein Benzolsulfonamid Derivat eine hohe Exzisionsrate von 93,8 % des Cre//loxP Systems beobachten. Auch Hormon induzierte Systeme, wie das durch β -Estradiol aktivierte XVE-System, konnten in Tomaten eine Rekombination des Cre//loxP Systems auslösen (Zhang et al. 2006), aber nur mit einer relativ geringen Effektivität von etwa 15 %. Für Versuche im Labor haben durch Hitze induzierbare Systeme eine weite Verbreitung. So konnten der HSP81-1 Promotor aus Arabidopsis (Arabidopsis: Hoff et al. 2001), der HSP70 Promotor aus Drosophila (Kartoffel: Zuo et al. 2001) oder der HSP17.5E Promotor aus Soja (Tabak: Wang et al. 2005, Mais: Zhang et al. 2003, Pappel: Fladung et al. 2010) erfolgreich eingesetzt werden, um eine Rekombination auszulösen. Der Einsatz eines induzierbaren Eindämmungssystems würde aber auch unter Umständen zu einem vorzeitigen Verlust der transgenen Eigenschaften im Feld führen, obwohl dort die zusätzlichen Eigenschaften bis zum Abreifen der Pflanzen gewünscht sind.

1.5 Konstruktdesign und Ziel der Arbeit

Um eine zuverlässige Entfernung der transgenen Eigenschaften aus dem Genom während der Pollenentwicklung zu gewährleisten, aber gleichzeitig Saatgut von transformierten Pflanzen herstellen zu können, wurde ein zweistufiges Rekombinationssystem entwickelt. Hierbei wurde eine pollenspezifische Exzision des gesamten Konstrukts durch die Insertion eines Aktivierungselements verhindert (Abb.4, Material und Methoden 2.1.3.7 und 2.1.3.8).

Das induzierbare Aktivierungselement bestand aus dem durch Hitzeschock induzierbaren GmHSP17.5E Promotor (Czarnecka et al. 1990), einer Rekombinase und war umgeben mit den entsprechenden Erkennungssequenzen der Rekombinase. Nach einer Hitzebehandlung sollte die Expression der Rekombinase zu einer Autoexzision des Aktivierungselements führen und den pollenspezifischen Promotor mit der zweiten Rekombinase zu einer Transkriptionseinheit verbinden. Der pollenspezifische Promotor ZmMADS2 (Schreiber et al. 2004) wurde eingesetzt, um während der Pollenentwicklung die zweite Exzision zu initiieren. Für die Exzisionen wurden das *Cre/loxP* und das *FLP/FRT* System genutzt. Um vermeintliche Variationen in der Effektivität der Rekombinasesysteme (Ringrose et al. 1998) ausgleichen zu können, wurde in dem Konstrukt pPollenEx1 die Aktivierung durch das *Cre/loxP* System vermittelt, während für die finale Exzision das *FLP/FRT* System eingesetzt wurde. Das Konstrukt pPollenEx2 hingegen wurde durch eine *FLP/FRT* Exzision aktiviert und für die finale Exzision des Konstrukts kam das *Cre/loxP* System zum Einsatz. Für die Selektion von transgenen Pflanzen wurden zusätzlich zwei Markergene integriert, das *bar* Gen als Selektionsmarker, für eine Resistenz gegen Gluphosinat-Herbizide und das Reportergen *uidA*, das eine Glucoronidaseaktivität vermittelt. Die Konstrukte sollten nach der Transformation in einem inaktiven Zustand im Genom der Pflanzen vorliegen und die übertragenen Eigenschaften unverändert in die nächsten Generationen weitergeben. Nach der Erstellung von Saatgut sollten die transgenen Pflanzen durch einen Hitzeschock aktiviert werden, was zu der Autoexzision des Aktivierungselements führt. Durch die folgende Aktivierung des zweiten Rekombinationssystems während der Pollenentwicklung würde eine zweite Exzision alle codierenden und regulierenden Sequenzen aus dem Pflanzengenom entfernen und nur ein kleiner Sequenzabschnitt von etwa 500 bp im Genom verbleiben.

Ziel der Arbeit war es, Maispflanzen mit den entsprechenden Konstrukten pPollenEx1 und pPollenEx2 zu transformieren. Nach dem Erhalt des Saatgutes der verschiedenen Linien sollte in der nächsten Generation die Aktivierung der Konstrukte mittels Hitzebehandlung durchgeführt werden. Die Aktivität des zweiten Rekombinationssystems wurde durch Auskreuzungsversuche, in denen eine Abweichung in der Segregation der Markergene als Hinweis auf eine Exzision des Konstrukts diente, überprüft. In Linien mit einer deutlichen Abweichung in der Segregation der Markergene sollten molekulare Analysen der Kreuzungsnachkommen die Exzision des Konstrukts bestätigen. Anschließend sollten genaue Untersuchungen des Integrationsortes die Stabilität während der Rekombinationsereignisse belegen und die finale Rekombination im Kontext des Genoms aufzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Arbeiten wurden Maispflanzen der Inzuchtlinien A188 (Green und Phillips, 1975), sowie die Linien Hill A und Hill B (Armstrong et al. 1991) verwendet. Diese wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und einer Lichtsumme von 650 klux h/d, 25°C/20°C Tag/Nacht) angezogen. Um vorzeitige, unkontrollierte Auskreuzungen zu vermeiden, wurden sich entwickelnde Kolben mit einer Papiertüte abgedeckt und die Bestäubung manuell vorgenommen. Für die biolistische Transformation wurden unreife Maisembryonen der Linie A188 14 Tage nach der Bestäubung verwendet. Für die Agrobakterien vermittelten Transformation wurden die unreifen Embryonen 11 Tage alte Nachkommen von den reziproken Kreuzungen zwischen Hill A und Hill B genutzt. Transgene Pflanzen wurden mit Pollen der Linien A188 oder Hill A bestäubt, um Saatgut zu erstellen. Für die Auskreuzungsversuche nach der Aktivierung der Konstrukte wurden Pflanzen der Linie A188 eingesetzt.

2.1.2 Bakterienstämme

Für Klonierungen und die Vermehrung von Plasmiden wurden der *E.coli* Stamm XL1-blue (Bullock et al. 1987) eingesetzt. Nach einer Transformation kompetenter Zellen (nach Inoue et al. 1990) erfolgte deren Anzucht bei 37°C auf LB-Medium (Miller, 1975), supplementiert mit einem, dem Vektor entsprechenden, Selektionsmittel (Ampicillin 100 µg/ml; Spectinomycin 100 µg/ml).

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 wurde auf YEB-Medium (Sambrook et al. 1989) supplementiert mit Tetracyclin (10 µg/ml) bei 28°C durchgeführt. Die Herstellung von kompetenten Zellen und deren Transformation erfolgte nach Höfgen und Willmitzer (1988). Nach der Transformation wurden die Zellen auf YEB-Mediumplatten mit

Tetracyclin (10 µg/ml) und Spectinomycin (100 µg/ml) selektiert. Die Anzucht von Agrobakterien für die Maistransformation wurde über Nacht in 30 ml flüssigen AB-Medium (Chilton, 1974), versetzt mit Tetracyclin 10 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml sowie 100 µM Acetosyringon, bei 28°C und 220 rpm durchgeführt. Bei dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurden die Kulturen geerntet und für die Transformation eingesetzt.

2.1.3 Plasmide

2.1.3.1 pJet1.2 (2974 bp)

Klonierungsvektor des CloneJet PCR Cloning Kit von ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland). Enthält das β-Lactamase-Gen *bla*, sowie den Replikationsursprung *rep*. Die Multiple Cloning Site liegt in der Sequenz des Endonukleasegens *eco47IR*, die Integration von überhanglosen PCR Fragmenten erfolgt über die Eco32I- Schnittstelle.

2.1.3.2 pD1-Ubi-FL-Bar-LF-GFP (5355 bp)

Testvektor für transiente Rekombination, basierend auf dem pD1-AF Vektor (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland). Enthält den ColE1 Replikationsursprung und ein Ampicillinresistenzgen. Darüber hinaus enthält der Vektor eine Rekombinationskassette, bestehend aus dem Ubi1 Promotor aus Mais (Christensen et al. 1992) mit dem ersten Intron, einer *FRT* Sequenz, einer *loxP* Sequenz, dem *bar* Gen mit T35S Terminator Sequenz, gefolgt von einer weiteren *loxP* und *FRT* Sequenz und anschließend einem *gfp* Gen mit integriertem STLS1-Intron (Vannanneyt et al. 1990) und NOS Terminator. Die Rekombinase Erkennungssequenzen sind so angeordnet, dass bei einer erfolgreichen Exzision das *bar* Gen aus dem Konstrukt entfernt wird und der verbleibende Ubi1 Promotor mit dem *gfp* Gen eine funktionelle Einheit bildet.

2.1.3.3 pD1-Ubi-L-GFP (4525 bp)

Testvektor pD1-Ubi-FL-Bar-LF-GFP nach der *in vitro* Rekombination mit einer Cre-Rekombinase. Im Vektor kommt es durch die Rekombination zur Exzision des *bar* Gens und der Neuverknüpfung des Ubi1-Promotors mit dem *gfp* Gen. Dieses führt zu einer kontinuierlichen Expression des *gfp* Gens.

2.1.3.4 pUbi-FLP (4757 bp)

Expressionsvektor, basierend auf dem pD1-AF Vektor (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) mit dem Ubi1 Promotor aus Mais (Christensen et al. 1992) sowie dem ersten Intron. Integriert wurde das native *flp* Gen aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Hartley und Donelson, 1980).

2.1.3.5 pUbi-FLPo (4757 bp)

Expressionsvektor, basierend auf dem pD1-AF (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) mit dem Ubi1 Promotor aus Mais (Christensen et al. 1992) sowie dem ersten Intron. Integriert wurde das sequenzoptimierte *flp* Gen (*flpo*, siehe Anhang), das in der Komposition der Codonzusammensetzung und in dem G/C-Gehalt für eine Expression in Mais angepasst wurde.

2.1.3.6 pUbi-FLPoi (4946 bp)

Expressionsvektor, basierend auf dem pD1-AF (DNA Cloning Service, Hamburg) mit dem Ubi1 Promotor aus Mais (Christensen et al. 1992) sowie dem ersten Intron. Integriert wurde das sequenzoptimierte *flp* Gen (*flpo*, siehe Anhang) in dem zusätzlich das STLS-1 Intron (Vanncanneyt et al. 1990) integriert wurde.

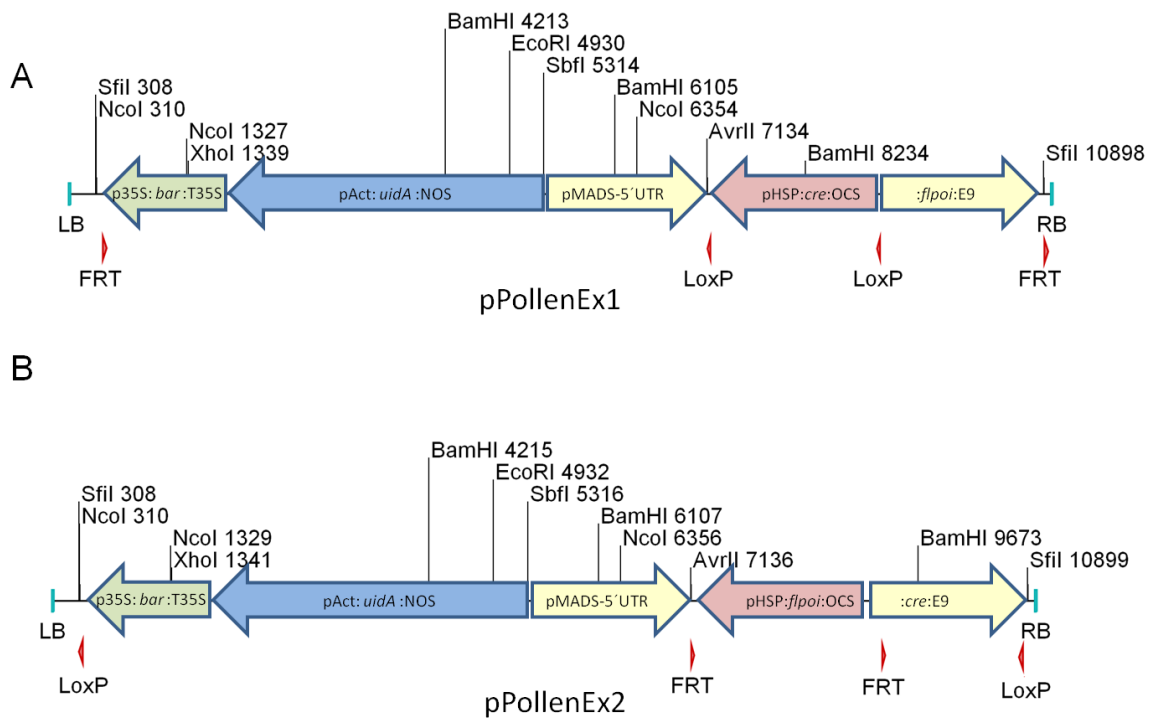


Abbildung 4: Schema des T-DNA Aufbaus von pPollenEx1 (A) und pPollenEx2 (B)

Die Konstrukte vermitteln in den Pflanzen zwei Selektionseigenschaften, eine Gluphosinatresistenz (grüner Pfeil) und eine β -Glucuronidase Aktivität (blauer Pfeil). Das Aktivierungselement (roter Pfeil), bestehend aus einem Hitzeschockpromotor und einem Rekombinasegen (pPollenEx1: *cre*, pPollenEx2: *flp*), unterbricht die Aktivität der gewebespezifischen Rekombinasekassette (gelbe Pfeile), bestehend aus dem ZmMADS2 Promotor und einem zweiten Rekombinasegen (pPollenEx1: *flp*, pPollenEx2: *cre*)

p35S: 35S Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *bar*: Gluphosinatresistenzgen, T35S: Terminatorsequenz, pAct: Reis Actin1 Promotor, *uidA* : β -Glucuronidase Gen, NOS: Nopalinsynthase Terminator, pMADS-5'UTR: ZmMADS2 Promotor mit dazugehörigem 5'UTR, pHSP: GmHSP17.5E Promotor, *cre*: Cre Rekombinase Gen, *flp*: kodonoptimiertes FLP Gen mit STLS-1 Intron, OCS: Octopinsynthase Terminator, E9: RuBisCo Terminator aus Erbse, LB und RB: Left- und Right Border Sequenz aus Agrobakterium, *FRT*: FLP Erkennungssequenz, *loxP*: Cre Erkennungssequenz

2.1.3.7 pPollenEx1 (18 200 bp)

Testvektor für die induzierbare, gewebespezifische Exzision von Transgenen aus Maispflanzen. Basierend auf dem pB-BA Plasmid (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) wurden zwischen die Left und Right Border Sequenzen zwei parallel angeordnete *FRT* Sequenzen integriert, die die zwei grundlegenden Genkassetten umschließen. Eine inverse (3'-5' orientiert) Genkassette im 5'- Bereich des Vektors enthält zwei verschiedene Selektionsmarker. Das Herbizidresistenzgen *bar* mit eingefügten STLS-1 Intron unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors und dem 35S Terminator. Darüber hinaus das *uidA* Gen, eine β -Glucuronidase, unter der Kontrolle des Reis Actin1-F Promotors

(McElroy et al. 1991) und dem NOS Terminator. Die zweite Genkassette umfasste die verschiedenen Rekombinaseeinheiten. Zwischen dem pollenspezifischen ZmMADS2 Promotor mit 5'-UTR (Schreiber et al. 2004) und dem optimierten mit STLS-1 Intron ausgestatteten *flp* Gen mit dem E9 Terminator der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase aus Erbse (Coruzzi et al. 1984) liegt ein invers orientiertes Aktivierungselement. Dieses besteht aus dem GmHSP17.5E Promotor (Czarnecka et al. 1985), dem *cre* Gen mit STLS-1 Intron und dem OCS Terminator und ist von zwei parallelen *loxP* Sequenzen umschlossen. Nach der Aktivierung des Konstrukts durch eine Hitzebehandlung führt die erfolgreiche Expression der Cre Rekombinase zu der Exzision des Aktivierungselements, so dass der ZmMADS2 Promotor das *flp* Gen reguliert. Zwischen dem Promotor und dem Rekombinasegen verbleibt eine *loxP* Sequenz. Während der pollenspezifischen Aktivität des ZmMADS2 Promotors kommt es zu einer Expression der FLP Rekombinase und zur Exzision der Konstruktbestandteile. Nach dieser gewebespezifischen Rekombination verbleiben nur noch die Left Border und Right Border Sequenzen im Genom, zusammen mit einer *FRT* Sequenz (503 bp).

2.1.3.8 pPollenEx2 (18 201 bp)

Der grundlegende Aufbau gleicht dem des pPollenEx1 Vektors, mit der Ausnahme, dass die jeweiligen Rekombinasegene und deren Erkennungssequenzen vertauscht worden sind. Das Aktivierungselement ist umgeben von *FRT* Sequenzen und die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors führt zu einer Expression der FLP Rekombinase. Nach der Exzision des Aktivierungselements reguliert der pollenspezifische Promotor ZmMADS2 die Expression der Cre Rekombinase, deren *loxP* Erkennungssequenzen am äußeren Rand des T-DNA Bereichs liegen. Nach der finalen Exzision verbleiben nur noch die Left und Right Border Sequenzen gemeinsam mit einer *loxP* Sequenz im Genom (504 bp).

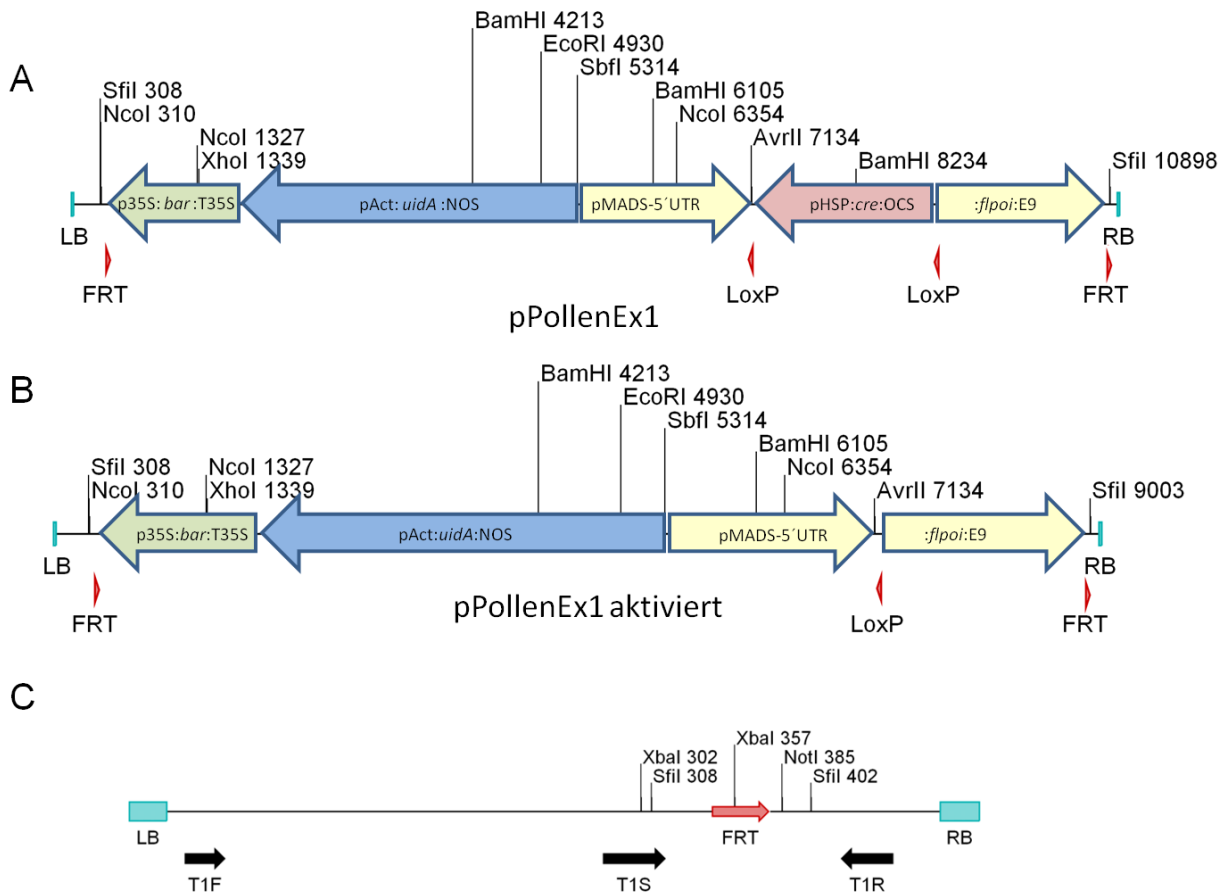


Abbildung 5 Schema der Rekombinationschritte am Beispiel pPollenEx1

Nach der Integration in das Genom vermittelt das inaktivierte Konstrukt (Bild A) in den Pflanzen eine Glufosinatresistenz (grüner Pfeil) sowie eine β -Glucuronidaseaktivität (blauer Pfeil). Nach einer Hitzebehandlung wird das Aktivierungselement (roter Pfeil) durch eine Autoexzision der Cre Rekombinase aus dem Konstrukt entfernt (Bild B) und erlaubt dadurch die gewebespezifische Aktivierung der zweiten Rekombinase FLP unter der Kontrolle des ZmMADS2 Promotors (gelbe Pfeile). Während der Pollenentwicklung in der Pflanze kommt es zu der zweiten Rekombination durch die FLP und die codierenden und regulierenden Sequenzen werden aus dem Genom entfernt (Bild C). Damit ist eine Ausbreitung von transgenen Eigenschaften über den Pollenpfad verhindert.

p35S: 35S Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *bar*: Glufosinatresistenzgen, T35S: Terminatorsequenz, pAct: Reis Actin1 Promotor, *uidA*: β -Glucuronidase Gen, NOS: Nopalinsynthese Terminator, pMADS-5'UTR: ZmMADS2 Promotor mit dazugehörigem 5'UTR, pHSP: GmHSP17.5E Promotor, *cre*: Cre Rekombinase Gen, *flpoi*: kodonoptimiertes FLP Gen mit STLS-1 Intron, OCS: Octopinsynthese Terminator, E9: RuBisCo Terminator aus Erbsen, LB und RB: Left- und Right Border Sequenz aus Agrobakterium, *FRT*: FLP Erkennungssequenz, *loxP*: Cre Erkennungssequenz

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA Fragmenten, Sequenzierung und Herstellung von markierten Sonden wurden von der Firma metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Funktion
dig-FLP-for	CCGACATCAAGAACGTGGACCC	Herstellung einer Dig markierten flp Sonde
dig-FLP-rev	GGTAGTCCAGAACCTCCTGGG	
dig-CRE-fw	GACGGTGGGAGAATGTTAATCC	Herstellung einer Dig markierten cre Sonde
dig-CRE-rev	GCTAATCGCCATCTTCCAGCAGGCGC	
PMEI-for	TTTCTATGTATGATTGATTCTTTTGATATAT AGGGC	Amplifikation des PME1 Promotors aus Mais
PMEI-rev	GTTCCGCTTCCGCTTCCAAACG	
PMEI-UTR-rev	GGTGTCTGCCGCTCTCGTTTCTC	
PMEI-Sbfl-for	CCTACCTGCAGGTTTCTATGTATGATTGAGAT TCTTTTGATATATAGGGC	Klonierung des PME1 Promotors
PMEI-AvrII-rev	CCTACCTAGGGTCCGCTTCCGCTTCCAAACG	
PMEI-UTR-AvrII-rev	CCTACCTAGGGGTGTCTGCCGCTCTCGTTTCTC	
FLP1	GATAGATAGATCCCGCCATCG	Analyse der in vitro Rekombinationen von pPollenEx1 und pPollenEx2
FLP4	CAGCATTGCTGTCACTTGGTCTG	
Cre4	GGGTCTTATACTTGAAGTGGAGGG	
RT-Cre-rev	GCCCCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG	Nachweis von Cre mRNA

Gap1	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG	Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase RNA in einer RT-PCR
Gap2	GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA	
T1F	GGCTTCATGTCCGGGAAATCTACATGGATCAGCA	Nachweis der gewebespezifischen Exzision
T1R	AAACGACAATCTGATCGGGTACCGGGCCAA	
IntOrtCre	CTAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTG	Bestimmung der Integrationsorte
IntOrtFLP	CTGACCAACGTGGTGGGCAACTGGTCTGACAAG	
IntOrtBar	CAAGCACGGGAACTGGCATGACGTGGGTTTCTG	
iPCR 5.8	CCTCCAGGATGGTGGCCTTCTGGGTCTTATACTTG	
iPCR 6.8	GCCTGTTTTGCACGTTACCGGCATCAACGTTT	
T1Fi	TGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAGCC	
T1Ri	TTGGGCCCGGTACCCGATCAGATTGTCGTTT	
T1S	GATGAGAAACTTCACGATCGGCTCTAGAGGCCATGGG	
T1Si	CCCATGGCCTCTAGAGCCGATCGTGAAGTTTCTCATC	
Anti-5'-5.8 A	CCGCAGAACCTGAAGATGTTCCG	
Anti-5'-5.8 B	CCACGACCAAGTGACAGCAATG	
Anti-5'-6.8 A	CCCACCGTCAGTACGTGAG	
Anti-5'-6.8 B	GAACGAACCTGGTCGAAATCAG	
Integrationsort A	CCTAAGGGCCAGATCTTGGG	
Integrationsort B	CAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCG	

2.1.4 Antikörper

Zur Detektion des Cre Proteins in Western Blot Analysen wurden folgende Antikörper verwendet:

Cre-Antikörper

Polyklonaler Anti-Cre Antikörper einer IgG-Fraktion aus Kaninchen (Novagen[®], San Diego, USA)

Anti-Rabbit IgG Antikörper

Monoklonaler Anti-Rabbit IgG (γ -Ketten spezifisch) Alkalische Phosphatase Konjugat aus Mauszellen (Sigma[®], Saint Louis, USA)

2.1.5 Medien

Alle Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 121°C und 2×10^5 Pa für 20 min autoklaviert, thermolabile Medien wurden sterilfiltriert. Selektionsmedien wurden vor Gebrauch mit entsprechenden Antibiotika oder dem Herbizid Glufosinat versetzt (Ampicillin und Spectinomycin 100 mg/l; Tetrazyclin 10 mg/l; Kanamycin 30 mg/l; Glufosinat 1,5 mg/l oder 3,0 mg/l). Festmedien wurden entweder mit 1,5 % (w/v) Agar oder 0,6 % (w/v) Gelrite oder Phytigel versetzt.

2.1.5.1 Grundmedien für die Transformation von Mais

Die einzelnen Stocklösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Medien wurden in doppelter Konzentration hergestellt, und für Festnährmedien mit gleichem Volumen kochendem 1,2 % (w/v) Gelrite™ oder Phytigel™ versetzt.

2x MS-Medium (nach Murashige und Skoog 1962)		
MS-Macrosalz-Lösung	(10x)	200 ml
MS-Microsalz-Lösung	(1000x)	2 ml
MS-Vitamine	(1000x)	2 ml
Fe/Na-EDTA	(500x)	4 ml
Saccharose		40 g
Ad 1000 ml ddH ₂ O		pH 5,7
sterilfiltrieren		

MS-Makrosalz-Lösung (10x)	
NH ₄ NO ₃	206 mM
KNO ₃	187,9 mM
KH ₂ PO ₄	12,5 mM
CaCl ₂	29,9 mM
MgSO ₄	15 mM

MS-Mikrosalz-Lösung (1000x)	
H ₃ BO ₃	100 mM
MnSO ₄	65 mM
ZnSO ₄	20 mM
Na ₂ MoO ₄	1 mM
CuSO ₄	0,1 mM
CoCl ₂	0,1 mM
KJ	4,8 mM

MS-Vitamine (1000x)	
Thiamin-HCl	0,33 mM
Nikotinsäure	4 mM
Pyridoxin-HCl	2,43 mM
Glycin	26,6 mM

Fe/Na-EDTA (500x)	
Na ₂ -EDTA	100 mM
FeSO ₄	100 mM

2.1.5.2 Medien für die Agrobakterien vermittelte Transformation von Mais

	Infektions-Medium	Cokultivations-Medium	Resting-Medium	Selektions-Medium I / II	Regenerations-Medium
N6-Medium (Chu, 1975)	1x	1x	1x	1x	-
MS-Medium	-	-	-	-	1x
L-Prolin	6 mM	6 mM	6 mM	6 mM	-
Saccharose	200 mM	88 mM	200 mM	200 mM	88 mM
Glucose	200 mM	-	-	-	-
AgNO ₃	-	7,5 µM	5 µM	5 µM	-
Cefotaxim	-	-	220 µM	220 µM	220 µM
Vancomycin	-	-	70 µM	70 µM	-
Glufosinat	-	-	-	17 µM / 34 µM	16 µM
2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure	-	-	2,5 mM	2,5 mM	-
Myo-Inositol	-	-	-	-	0,5 mM
L-Cystein	-	2,5 µM	-	-	-
2,4-Dichlor- phenoxyessigsäure	-	10 µM	6.5 µM	6,5 µM / -	-
Acetosyringon	100 µM	100 µM	-	-	-
Silwett L-70	150 ppm	-	-	-	-
Phytigel™	-	-	0,6 %	0,6 %	-
Gelrite™	-	0,6 %	-	-	0,6 %
pH	5,2	5,8	5,8	5,8	5,8

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Embryo Rescue

14 bis 21 Tage nach der Bestäubung wird der Kolben von der Maispflanze entfernt und unter sterilen Bedingungen die unreifen Embryonen aus dem Korn präpariert. Die unreifen Embryonen werden mit dem Scutellum nach unten auf MS-Mediumplatten gelegt. Nach etwa einer Woche beginnen vitale Embryonen zu keimen. Nach dem Ausbilden der Primärwurzel können die Keimlinge in Aussaaterde gepflanzt werden und im Gewächshaus zu neuen Pflanzen angezogen werden.

2.2.1.2 Transformationsmethoden

2.2.1.2.1 Biolistische Transformation

Die transiente Transformation von Geweben wurde durch den Beschuss mit Goldpartikeln (0,4 – 0,8 μm , Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt, die an ihrer Oberfläche gebundene Plasmide in das Gewebe transportieren sollten. Die 40 mg Goldpartikel wurden zunächst in 1 ml Ethanol resuspendiert und Aggregate für 30 sek im Ultraschallbad bei höchster Intensität zerstört. Die Suspension der Goldpartikel wurde für 30 sek bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Behandlung wurde dreimal wiederholt, um die Goldpartikel zu reinigen und gebildete Konglomerate aus Partikeln möglichst effizient wieder zu zerstören. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Goldpartikel in 1ml sterilem ddH₂O wieder aufgenommen. Erneut wurden Aggregate im Ultraschallbad für 30 sek zerstört und die Goldpartikel wieder abzentrifugiert. Auch diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach einer erneuten Aufnahme der Goldpartikel in ddH₂O wurde diese als 50 μl Aliquots bei -20°C gelagert. Für die biolistische Transformation von Gewebe wurden zunächst die jeweiligen Plasmide an Goldpartikel gebunden. Hierfür wurden 50 μl der

Goldpartikelsuspension mit maximal 10 µg Plasmid DNA versetzt und auf Eis für 15 min inkubiert. Separat wurden 20 µl einer 0,1 M Spermidin Lösung mit 50 µl einer 2,5 M CaCl₂ Lösung vermischt. Beide Mischungen wurden dann gründlich vermengt und 15 min auf Eis gelagert. Die Mischung wurde 10 sec bei 4000 g zentrifugiert und die Goldpartikel in 250 µl Ethanol wieder aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 sec bei 4000 g wurden die Goldpartikel erneut in 240 µl Ethanol resuspendiert und auf Eis gelagert. Für die biolistische Transformation wurden in dieser Arbeit unreife Embryonen der Linie A188 eingesetzt. Diese wurden 14 Tage nach der Bestäubung unter sterilen Bedingungen aus dem Kolben isoliert und mit dem Scutellum nach oben auf MS-Mediumplatten gelagert. Der Partikelbeschuss der Embryonen wurde mit der Partikelkanone PDS 1000/He (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt, unter Einsatz von 4 µl der zuvor vorbereiteten Goldpartikelsuspensionen und mit einem Gasdruck von 75,84 bar (1100 psi). Die Embryonen wurden nach der Transformation bei 22°C über Nacht gelagert und am nächsten Tag ausgewertet.

2.2.1.2.2 Agrobakterien-vermittelt Transformation von Maisembryonen

Für die Transformation von unreifen Maisembryonen wurde der *Agrobakterien tumefaciens* Stamm LBA4404 genutzt. Dieser wurden nach der Transformation mit einem binären Vektorkonstrukt in 30 ml AB-Medium (Chilton et al. 1974) supplementiert mit 300 µg Spectinomycin, 45 µg Tetracyclin und 100 µM Acetosyringon bei 28°C und 220 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,8 inkubiert. Die Zellkultur wurde durch 5 min zentrifugieren bei 5000 g geerntet. Die Zellen wurden mit einer 10 mM MgCl₂ Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Infektionsmedium resuspendiert, so dass sie eine OD₆₀₀ von 0,5 besaßen. Mit dieser Bakteriensuspension wurde die Infektion der Maiskörner durchgeführt. Für die Transformation von Mais mit *Agrobakterium tumefaciens* wurden die Inzuchtlinien Hill A und Hill B reziprok miteinander gekreuzt. Nach 11 Tagen wurden die unreifen Embryonen unter sterilen Bedingungen isoliert. Während der Isolation wurden die Embryonen in Infektionsmedium gelagert. Die unreifen Embryonen werden in die vorbereitete Agrobakterien Suspension gegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Cokultivierungsplatten überführt. Nach einer

Inkubation über Nacht bei 21°C wurden sämtliche Embryonen auf neue Cokultivierungsplatten überführt und dabei einmal gewendet. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht bei 21°C wurden die Embryonen mit dem Scutellumgewebe nach oben auf Restingmediumplatten überführt. Nach einer Inkubation von einer Woche bei 26°C wurden die austreibenden Embryonen entfernt und das verbleibende vitale Scutellumgewebe auf Selektionsmediumplatten mit 17 µM Glufosinat transferiert, nekrotische Gewebe wurden dabei entfernt. Nach zwei Wochen bei 28°C wurden sich entwickelnde vitale Kallusstrukturen auf neue Selektionsmediumplatten mit 34 µM Glufosinat überführt. Nach weiteren vier Wochen Inkubation bei 28°C, in denen absterbendes Kallusgewebe sorgfältig entfernt wurde, sollten sich erste differenzierte Pflanzengewebe aus den Kalli entwickelt haben. Diese wurden auf Regenerationsmedium in einer Lichtkammer (24°C, 16 Stunden Licht, 25 klux/h) erst in Petrischalen bis zur Ausbildung von vitalen Blatt und Wurzelgeweben und später in Magentadosen inkubiert. Nach einer ausreichenden Bewurzelung wurden die regenerierten Pflanzen in Aussaaterde gepflanzt und in das Gewächshaus überführt, wo sie in der ersten Woche unter einer Plastikhaube zusätzlich vor dem Austrocknen geschützt wurden. Anschließend wurden die regenerierten Pflanzen dreimal in Abstand von vier Tagen mit einer BASTA[®]-Lösung (250 mg/l Glufosinat) besprüht. Überlebende Pflanzen wurden weiter physiologisch und genetisch untersucht, um die erfolgreiche Transformation der Konstrukte zu bestätigen.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Sämtliche grundlegenden molekular biologischen Arbeiten, wie unter anderem Isolation von Plasmid DNA, Restriktion, Ligation, Fällung und Quantifizierung von DNA wurden soweit nicht anders beschrieben nach Sambrook et al. 1989 durchgeführt. Verwendete Enzyme oder Kits wurden soweit nicht anders angegeben nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Sequenzierungen wurden bei Eurofins (Hamburg, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die Planung von Klonierungsstrategien, Sequenzanalysen und Primerdesign wurden mit CloneManager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) durchgeführt, für Sequenzabgleiche der Integrationsorte wurden die Plattform Maize Genome Database (www.maizegdb.org) und www.maizesequence.org genutzt.

Verwendete Kits:

Plasmidisolation:

AveGene High-Speed Plasmid Mini/Midi Kit (Pacific Image Electronics Co., Ltd, New Taipei, Taiwan)

Gelextraktion und PCR-Reinigung:

AveGene Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Pacific Image Electronics Co., Ltd, New Taipei, Taiwan)

RNA Isolation:

peqGold TriFast™ (peqlab, Erlangen, Deutschland)

Klonierung von PCR Fragmenten:

CloneJET PCR Kloning Kit (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland)

Cre-Rekombination der Kontrukte:

Creator™ DNA Cloning Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)

2.2.2.1 Aufarbeiten von Pflanzenmaterial

100 – 300 mg Pflanzenmaterial wurden zusammen mit drei Stahlkugeln (5 mm) in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Schwingmühle (Mixer Mill, MM300, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) bei 30 Hz für 2 Minuten gemörsert. Die Stahlkugeln wurden entfernt und das verbleibende Pulver für die Isolation von gDNA, RNA oder die Herstellung von Proteinextrakt verwendet.

2.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus aufgearbeitetem Pflanzengewebe wurden nach dem Protokoll von Palotta und Mitarbeitern (2000) bearbeitet. Die isolierte gDNA wurde in 35 µl RNase Lösung resuspendiert und der DNA Gehalt photometrisch bestimmt (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

2.2.2.3 Southern Blot

Für den Nachweis von spezifischen DNA Fragmenten in genomischer DNA wurden Southern Blot Experimente (Southern, 1975) nach dem Protokoll für Filterhybridisierung von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden Digoxigenin-11-dUTP markierte Sonden von der kodonoptimierten mit STLS-1 Intron versehenen *flp* Sequenz (666 bp) und der *cre* Sequenz (658 bp) abgeleitet. Mit der Primerkombination dig-FLP-for und dig-FLP-rev, beziehungsweise dig-CRE-for und dig-CRE-rev, wurden PCR nach folgendem Schema durchgeführt. Als Template für die Markierung wurden zuvor mittels PCR amplifizierte und gereinigte DNA-Fragmente benutzt. Der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP in das amplifizierte Fragment wurde durch Gelelektrophorese verifiziert, wobei gleichzeitig die Konzentration in der PCR Reaktion abgeschätzt wurde.

PCR Ansatz	
Taq-Polymerase	2,5 U
dATP	100 µM
dGTP	100 µM
dCTP	100 µM
dTTP	60 µM
dig-dUTP	15 µM
MgCl ₂	1,5 mM
Primer	Je 0,5 µM
Template	100 fg
Ad 50 µl H ₂ O	

PCR-Konditionen			
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	45 sek	30 x
Annealing	57°C	45 sek	
Elongation	70°C	2 min	
Finale Elongation	70°C	7 min	

Eine erfolgreiche PCR wurde direkt für die Herstellung einer Sonde eingesetzt, in einer Konzentration von 7,5 ng/ml bis 10 ng/ml. Die Effektivität der Sonde wurde durch den Nachweis von 100 fg spezifischem Fragment in einer Restriktion von 20 µg genomischer DNA getestet. Für den Southern Blot wurden 20 µg genomischer DNA in einem Volumen von 40 µl mithilfe einer Endonuklease verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Durch einen Kapillarblot wurden die DNA Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) übertragen und dort mittels 1200 mJ UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagen, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Die Hybridisierung der Membran mit der markierten Sonde bei 48°C und die anschließende Detektion mittels CSPD Chemilumineszenz erfolgte nach Herstellerangaben von Roche Diagnostic (Mannheim, Deutschland) durch die Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ MP, Amersham GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland).

2.2.2.4 Nachweis der Expression der Cre Rekombinase mittels RT-PCR

Die Isolation von RNA wurde mit dem peqlab TriFast™ System (peqlab, Erlangen, Deutschland) aus 100 - 200 mg aufgearbeitetem Pflanzenmaterial nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte RNA wurde vor der weiteren Analyse durch Agarosegelelektrophorese auf ihre Integrität geprüft.

Für die Amplifikation der *cre* mRNA wurden die Primer dig-CRE-for und RT-Cre-rev eingesetzt. Die cDNA Synthese wurde mit der RevertAid Reverse Transkriptase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben aus 2 µg RNA durchgeführt. Als Kontrolle der cDNA Synthese wurde parallel die mRNA der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit Hilfe der Primer GAP1 und GAP2 nachgewiesen.

2.2.2.5 Nachweis der Cre Rekombinase mittels Western Blot

300 mg Blattmaterial wurde aufgearbeitet (2.2.2.1) und mit 300 µl Extraktionspuffer (125 mM TRIS, 10 % (v/v) SDS, 25 % (v/v) Glycerin, 12,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8) versetzt. Nach einer Inkubation für 10 min bei 100°C und dem Abkühlen auf Eis wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 21 000 g und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels Bradford-Reagenz gemessen. Die Auftrennung von pflanzlichem Rohextrakt mit einem Proteingehalt von insgesamt 20 µg Protein wurde in einer 12,5 % Tris-Glycin SDS-PAGE von peqlab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der SemiDry Blots (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 100 mA für 2,5 Stunden auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Millipore Cooperation, Bedford, USA) übertragen. Der vollständige Transfer der Proteine wurde durch das Überschichten mit Ponceau S Lösung bestätigt. Die Hybridisierung mit dem Anti-Cre Antikörper (Novagen®, San Diego, USA) erfolgte für eine Stunde bei 4°C in einer Verdünnung 1:10 000. Nach dem Waschen der Membran folgte ein zweiter Hybridisierungsschritt mit dem zweiten Antikörper Anti-Rabbit IgG (γ-Ketten spezifisch) über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung von 1:100 000. Nach einem erneuten Waschen der Membran folgte eine CSPD Detektion der Hybridisierung nach dem Protokoll

der Southern Blot Detektion (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und einem Nachweis der Chemilumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ MP, Amersham GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland).

2.2.2.6 Inverse PCR zur Integrationsortbestimmung

Für die Integrationsortbestimmung durch inverse PCR wurde jeweils 5 µg genomischer DNA mit verschiedenen Endonukleasen nach Herstellerangaben in einem 20 µl Ansatz restringiert. Nach einer Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme wurde die Ligation in einem 200 µl Volumen durchgeführt. Hierfür wurden die 20 µl inaktivierte Restriktion mit 158 µl ddH₂O verdünnt und mit 20 µl Ligationspuffer und 2 µl T4-Ligase (20 Weiss Units) (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) für zwei Stunden bei 22°C inkubiert. Aus dieser Religation wurden 4 µl (100 ng genomische DNA) entnommen und mit Hilfe des Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) eine inverse PCR in einem 20 µl Ansatz durchgeführt. Aufgrund der unbekanntem Länge der einzelnen Fragmente und dem hohen G/C-Gehalt des Mais Genoms wurde das Puffer System 3 (>12 kb) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Erste Amplifikation				Zweite Amplifikation			
1	94°C	120 sek		1	94°C	15 sek	
2	94°C	10 sek		2	58°C/65°C	30 sek	24x
3	58°C/65°C	30 sek	9x	3	68°C	300 sek + 20 sek pro Zyklus	
4	68°C	300 sek		4	68°C	420 sek	

Nach der inversen PCR wurden 19 µl des Ansatzes durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert und definierte Banden aus dem Gel isoliert und für eine Sequenzierung subkloniert. 1 µl des Ansatzes wurde mit 19 µl ddH₂O verdünnt und erneut für eine inverse PCR eingesetzt. Diese PCR wurde mit einer Primerkombination durchgeführt, die außerhalb des ersten Primerpaares bindet, so dass unspezifische Amplifikate vermieden wurden. Auch

sollte diese neue Primerkombination, aufgrund ihrer weiter außen auf dem Konstrukt liegenden Bindestellen, ein Amplifikat mit geringerer Größe erzeugen als die erste inverse PCR, was die Analyse von falsch positiven Banden erleichtert. Auch diese Ansätze werden durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert und bestätigte distinkte Banden isoliert und für eine Sequenzierung subkloniert.

2.2.3 Histochemischer β -Glucuronidase Test

Die Expression des transformierten *uidA* Gens in Pflanzen und die dadurch vermittelte β -Glucuronidaseaktivität wurde mit Hilfe eines histochemischen GUS-Tests detektiert (Jefferson et al. 1987). Hierzu wurden Blattfragmente in GUS-Färbepuffer (McGabe et al. 1988), der das Substrat X-GlcA (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) enthielt über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einer Entfärbung durch eine Eisessig/Ethanol-Mischung (1:3) bei 37°C konnte bei Pflanzen, die das *uidA* Gen besaßen, eine Blaufärbung der Blätter nachgewiesen werden.

2.2.4 Hitzeaktivierung der Konstrukte in Keimlingen

Jeweils 10 Körner einer Maislinie wurden mit Leitungswasser überschichtet und über Nacht bei 4°C vorgequollen. Nach dem Abgießen wurden die Körner für 20 Minuten in einer 2% NaOCl-Lösung mit 0,1 % Mucosol (Merz GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) oberflächensterilisiert. Die Körner wurden nach dreimaligem Waschen mit sterilem ddH₂O in Petrischalen zwischen feuchtes Whatman® Papier (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) gelegt und für zwei Tage bei 22°C inkubiert. Danach wurden die Petrischalen mit den Körnern für 6 Stunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, gefolgt von einer Regeneration für 18 Stunden bei 22°C. Nach vier Wiederholungen der Hitzebehandlung wurden die Keimlinge nach der letzten Regeneration in das Gewächshaus überführt und in Erde gepflanzt. Durch eine GUS Färbung wurden transgene Pflanzen ermittelt und deren vollständige Aktivierung durch ein Southern Blot Experiment überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

3.1.1 Kodonoptimierung der FLP Rekombinase

In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Exzisionen und Integrationsversuche mit den Rekombinasen FLP und Cre durchgeführt. Hierbei konnte eine effektive Rekombinationsleistung der Cre Rekombinase in Mais und Weizen nachgewiesen werden (Kerbach et al 2005), während erfolgreiche Rekombinationen der FLP nur in Pappeln gezeigt werden konnten, nicht dagegen in Mais und Weizen (Kerbach et al. 2005, Fladung et al. 2010). Für die Rekombinationsexperimente im Mais war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch erforderlich eine hohe Frequenz an FLP induzierten Rekombinationen zu erreichen. Da auszuschließen war, dass die geringe Aktivität der FLP Rekombinase in Mais und Weizen auf Grund der verwendeten Promotoren verursacht sein könnte, wurde die Nukleotidsequenz der nativen FLP Rekombinase auf deren Kodonverwendung hin untersucht und mit der Kodonverwendung von Mais verglichen. Hierzu wurde die Codon Usage Data Base (www.kazusa.or.jp/codon/) verwendet. Der durchschnittliche G/C-Gehalt der Nukleotidsequenz der FLP Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (36,9 % G/C) und der des Maisgenoms (*Zea mays* L.; 54,98 % G/C) ergaben jedoch gravierende Unterschiede, die unter Umständen die schlechte Rekombinationsleistung der FLP Rekombinase in Mais erklären könnten. Um diese Hypothese zu testen und eine effektive FLP für die Anwendung in Mais zu erhalten, wurde die genomische Sequenz der FLP Rekombinase mit Hilfe der für Mais erhaltenen Kondonnutzung und des G/C-Gehalts angepasst (Abb.31 und 32). Für den generellen Vergleich der Rekombinationseffektivität der FLP und der optimierten FLP (FLPo) in Mais wurde ein Versuchsaufbau mit transienten Transformationen eingesetzt. Hierfür wurde der Vektor pD1-Ubi-FL-bar-LF-GFP (Abb.6A, Material und Methoden 2.1.3.2) eingesetzt. Im Ausgangszustand des Vektors folgte dem Promotor, der aus dem Ubiquitin Promotor aus Mais und dem dazugehörigen ersten Intron besteht, ein *bar* Gen, das von *FRT* und *loxP* Sequenzen flankiert war, gefolgt von einem promotorlosen *gfp* Reporter gen. Im Falle einer gemeinsamen Transformation mit einem die FLP oder Cre Rekombinase

exprimierenden Vektor würde die Expression der Rekombinase zu einer Exzision des *bar* Gen führen. Dieses hätte zu Folge, dass der Ubiquitin Promotor nach der erfolgreichen Rekombination vor das ehemals promotorlose *gfp* Gen gesetzt würde und eine Expression des *gfp* Gens induziert (Abb. 6B). Die GFP-Expression kann durch Betrachtung unter UV-Licht überprüft werden.

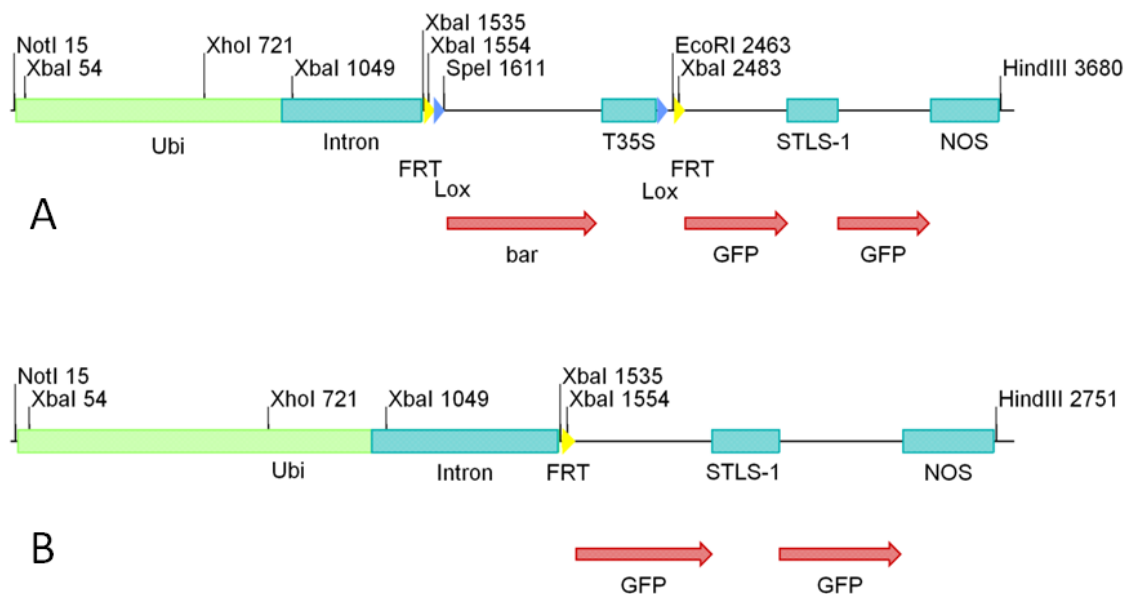


Abbildung 6: Rekombination des Testvektor pD1-Ubi-FL-Bar-LF-GFP

Die Abbildung zeigt die relevanten Bestandteile des Vektors pD1-Ubi-FL-bar-LF-GFP, während einer Rekombination mit der FLP Rekombinase. Das Konstrukt besteht aus einem Ubi1 Promotor aus Mais zusammen mit dessen erstem Intron, gefolgt von einem *bar* Gen und dessen Terminator (T35S). Um das *bar* Gen liegen *FRT* und *loxP* Sequenzen in paralleler Orientierung für eine Exzision. Abschließend folgt das *gfp* Gen ausgestattet mit einem STLS-1 Intron sowie dem NOS Terminator (A). Bei einer erfolgreichen Expression einer FLP Rekombinase erfolgt eine Exzision, die das *bar* Gen zusammen mit dem Terminator aus dem Konstrukt entfernt und den Ubi1 Promotor vor das *gfp* Gen setzt (B). Die folgende GFP-Expression kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ubi: Ubiquitin Promotor 1 aus Mais, Intron: erstes Intron des Ubiquitins 1 aus Mais, *FRT*: FLP Erkennungssequenz, *loxP*: Cre Erkennungssequenz *loxP*, *bar*: Gluphosinatresistenzgen, T35S: Terminatorsequenz des CaMV 35S, GFP: Gen des Green Fluoreszenz Protein, STLS-1: STLS-1 Intron aus der Kartoffel, NOS: Nopalinsynthasegen Terminatorsequenz aus Agrobakterien

In den folgenden Tests wurde die Effektivität der nativen FLP, der codonoptimierten FLPO sowie einer FLPO Variante (FLPoi) mit einem zusätzlichen, in die codierende Sequenz inserierten, STLS-1 Intron aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) miteinander verglichen. Die verschiedenen FLP Sequenzen wurden in einen pD1-Ubi-Vektor vor den Ubiquitin Promotor

aus Mais kloniert, um eine vektorunabhängige Expression zu gewährleisten. Die verschiedenen Expressionsvektoren der FLP Rekombinase wurden in 14 Tage alte Maisembryonen zusammen mit dem Testvektor pD1-Ubi-FL-bar-LF-GFP mittels biolistischer Transformation ko-transformiert. Die Expression der FLP Rekombinase in transformierten Zellen sollte die Rekombination des Testvektors auslösen, so dass Zellen mit dem rekombinierten Vektor eine Expression des *gfp* Gens zeigen sollten. Zur Normalisierung der Rekombinationsexperimente wurden in einem zweiten Ansatz der bereits *in vitro* rekombinierte Vektor pD1-Ubi-L-GFP transformiert. Die Anzahl an GFP Signalen pro Embryo in dieser Positivkontrolle wurde als maximale Effizienz der Rekombination definiert und die von den unterschiedlichen Testansätzen erreichte Anzahl an GFP Signalen gegen diesen Wert normalisiert.

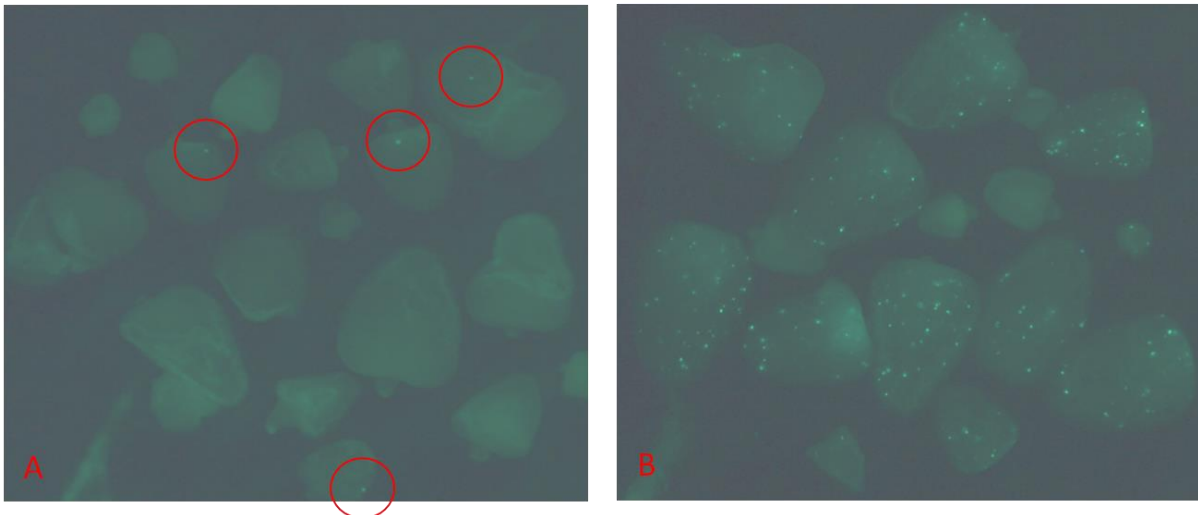


Abbildung 7: Fluoreszenznachweis der Rekombination in Mais

Unreife Maisembryonen der Linie A188 wurden 14 Tage nach der Bestäubung aus dem Kolben isoliert und auf MS-Medium gelagert. Das Skutellumgewebe wurde durch den Beschuss mit Goldpartikel transformiert. An die Goldpartikel waren zwei verschiedene Plasmide in gleichen Mengen gebunden, einmal der Testvektor pD1-Ubi-FL-bar-LF-GFP (siehe 2.1.3.2) und einer der FLP-Expressionsvektoren (siehe 2.1.3.4 - 6). Als Kontrolle der Transformation der Vektor pD1-Ubi-L-GFP transformiert, der ein konstitutives GFP-Signal exprimierte (siehe 2.1.3.3), mit dem parallel die Effektivität der Transformation überprüft wurde. Bei einer Expression der FLP-Rekombinase, reguliert durch den Ubi1-Promotor, führt die Exzision des *bar*-Fragmentes aus dem Testvektor zu einer GFP-Expression. Transformationsansätze mit der ursprünglichen *flp*-Sequenz aus Hefe führten nur zu einer geringen Anzahl an GFP-Signalen (A), das als Zeichen für eine geringe Expression gedeutet wurde. Die Anpassung der DNA-Sequenz des *flp*-Gens im G/C-Gehalt und in der Codon Nutzung führte zu einer deutlich verbesserten Expression, das durch die hohe Anzahl an GFP-Signalen gezeigt werden konnte (B).

In 13 parallelen Wiederholungen konnten 580 Maisembryonen mit pUbi-FLP, 600 Maisembryonen mit pUbi-FLPo und 520 Maisembryonen mit pUbi-FLPoi mit 355 Maisembryonen für pUbi-L-GFP verglichen werden. Durch die hohe Anzahl an parallel

durchgeführten Versuchen und die folgende Normierung konnten störende Faktoren, wie die Transformationseffizienz und Unterschiede bei den verwendeten Embryonen, minimiert werden. Die Auswertungen der relativen Rekombinationseffizienz der optimierten FLP (FLPo) ergaben eine durchschnittliche Rekombinationseffizienz von 65,3 %, das einer Steigerung um den Faktor 29,7 entspricht.

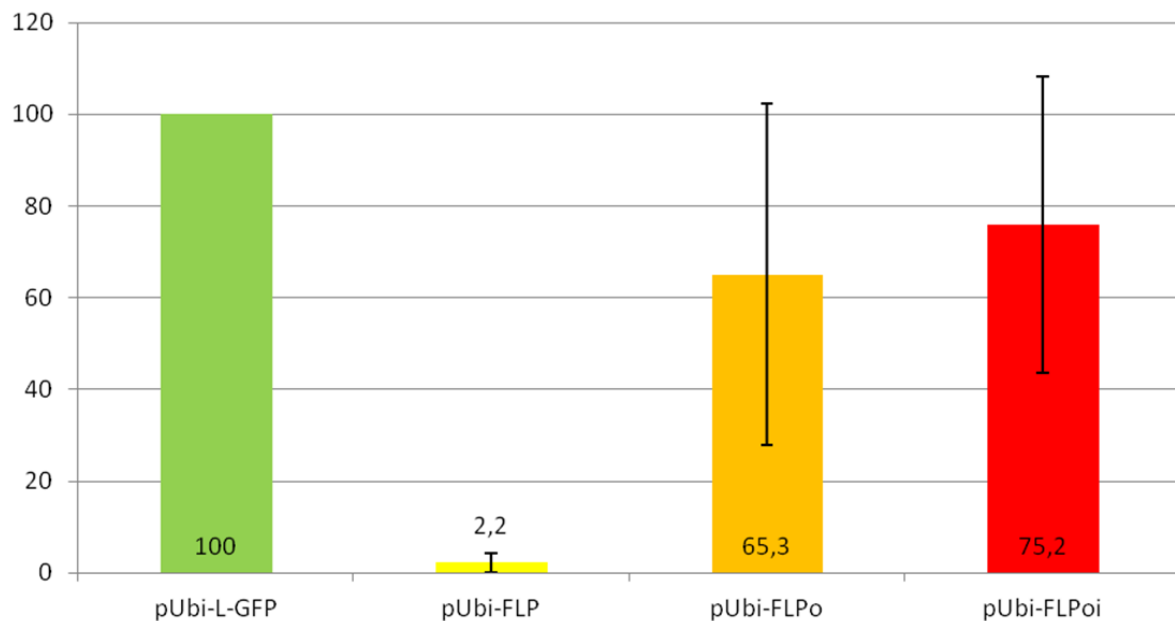


Abbildung 8: Prozentualer Vergleich in der Effektivität der Rekombination von unterschiedlichen *flp*-Sequenzen

Die Cotransformation von Maisembryonen mit dem Testvektor pD1-Ubi-FL-bar-LF-GFP (siehe 2.1.3.2) und Expressionvektoren von verschiedenen *flp*-Sequenzen (siehe 2.1.3.4 - 6) führte bei erfolgreicher Expression der FLP Rekombinase zu einer Exzision in dem Testvektor. Die Folge der Exzision ist eine Verknüpfung eines Ubi1 Promotors mit einem promotorlosen *gfp*-Gen. Diese Exzision konnte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und die relative Anzahl an GFP-Signalen wurde als Maß der Expressionsstärke der FLP-Rekombinase gewertet. Um die Werte gegen die Effektivität der Transformation normieren zu können, wurde parallel ein konstitutiv exprimiertes GFP-Signal transformiert (pUbi-L-GFP, siehe 2.1.3.3) und die resultierende Anzahl an GFP-Signalen als 100 % Effektivität postuliert. Die Transformation des Testvektors und der nativen *flp* Sequenz (pUbi-FLP, siehe 2.1.3.4) führte im Vergleich zu der Transformationskontrolle nur in 2,2 % der Fälle zu einem GFP-Signal. Die Veränderung des G/C-Gehalts und die Anpassung an die Kodon-Nutzung von Mais (pUbi-FLPo, siehe 2.1.3.5) steigerte die relative Anzahl an GFP-Signalen deutlich, im Mittel auf 65,3 %. Eine nachträgliche Integration des STLS-1 Introns (pUbi-FLPoi, siehe 2.1.3.6) führte zu einer weiteren Verbesserung der relativen Anzahl von GFP-Signalen auf 75,2 % im Vergleich zur Positivkontrolle.

Die Integration des STLS-1 Introns in die Sequenz wurde daraufhin auch auf mögliche negative Einflüsse in der Expression, beziehungsweise Rekombinationseffizienz, hin untersucht. Die Auswertung zeigte eine relative Rekombinationseffizienz von 75,2 % für die FLPoi, also eine erneute Steigerung um den Faktor 1,15 im Vergleich zu der FLPo. In diesen Versuchen konnte durch die Sequenzanpassung die relative Rekombinaseaktivität der FLP in

Mais von 2,2 % auf 75,2 % um den Faktor 34,1 gesteigert werden. Dieses war eine Grundvoraussetzung, um das Projekt durchführen zu können.

3.1.2 Die Vektoren pPollenEx1 und pPollenEx2

Die Vektoren dieser Arbeit, pPollenEx1 und pPollenEx2 (Abb.4, Material und Methoden 2.1.3.7 und 2.1.3.8) wurden von der Firma DNA-Cloning Service (Hamburg, Deutschland) erstellt. Diese binären Vektoren basieren auf dem Grundvektor pB-BA und besaßen grundsätzlich zwei Replikationsursprünge, ColeE1 für eine Replikation in *E. coli* sowie den pVS1 ORI, der die Replikation in *A. tumefaciens* ermöglichte und die Spectinomycin/Streptomycin Resistenz. Nach der Left Border Sequenz folgte der Selektionsbereich der Konstrukte. Dieser bestand aus dem *bar* Gen unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors für eine negative Selektion während der Transformation und dem *uidA* Gen unter Kontrolle des konstitutiven Actin-1F Promotors aus Reis. Alle transgenen Pflanzen waren dadurch GUS-positiv. Der zweite Bereich der Konstrukte sollte die Aktivierung und Weitergabe der transgenen Sequenzen in den Pollen regulieren und war in den beiden Konstrukten unterschiedlich aufgebaut. In dem Konstrukt pPollenEx1 beinhaltete der Bereich den pollenspezifischen Promotor ZmMADS2, gefolgt von dem in parallele *loxP* Sequenzen eingefassten Aktivierungselement, an den sich die FLP Rekombinase mit E9 Terminatorsequenz und die Right Border Sequenz anschloss. Für die FLP Rekombinase wurde die optimierte mit Intron ausgestattete Sequenz (FLPoi) eingesetzt, deren Rekombinationssequenzen in diesem Konstrukt in paralleler Orientierung an den äußeren Randbereichen der integrierten T-DNA, aber noch zwischen den Integrationssequenzen der Left- und Right- Border lagen. Das Aktivierungselement des Konstrukts pPollenEx1 bestand aus dem Hitze induzierbaren Promotor GmHSP17.5E und der mit einem STLS-1 Intron ausgestatteten Cre Rekombinase gefolgt von dem OCS Terminator. Das Aktivierungselement war invers zum ZmMADS2 Promotor orientiert, um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Bei einer hitzeinduzierten Expression der Cre Rekombinase würde das in *loxP* Sequenzen eingefasste Aktivierungselement sich selbst aus dem Konstrukt entfernen und den pollenspezifischen Promotor ZmMADS2 vor die FLP Rekombinase setzen. Während der nächsten Pollenentwicklung würde die gewebespezifische Aktivität des Promotors zu einer

Expression der FLP Rekombinase führen, welches eine Autoexzision sämtlicher codierender und regulierender Sequenzen auslöst. Im Wirtsgenom würde nach dieser Rekombination nur noch ein Fragment von etwa 500 bp verbleiben, bestehend aus den Integrationssequenzen und einer *FRT* Rekombinationserkennungssequenz. Der Vektor pPollenEx2 war grundlegend ähnlich aufgebaut wie der Vektor pPollenEx1, mit dem Unterschied, dass hier die Rekombinasen für die Aktivierung und die finale Autoexzision in ihrer Reihenfolge vertauscht waren. Bei einer hitzeinduzierten Aktivierung der Konstrukte würde der GmHSP17.5E Promotor die Expression der FLP Rekombinase auslösen. Das entsprechende Aktivierungselement ist in diesem Fall von parallelen *FRT* Sequenzen flankiert, die nach der Autoexzision den gewebespezifischen Promotors ZmMADS2 und die *cre* Rekombinase zu einer funktionellen Einheit verbinden. Bei einer gewebespezifischen Aktivierung des ZmMADS2 Promotors während der Pollenentwicklung führt die Expression der Cre Rekombinase zu einer Rekombination zwischen den, in diesem Fall im Randbereich der T-DNA liegenden, *loxP* Sequenzen, die erneut eine Autoexzision der codierenden und regulierenden Sequenzen ermöglicht. Im Wirtsgenom würden in diesem Fall erneut ein nur etwa 500 bp großes Fragment verbleiben, bestehend aus den Integrationssequenzen und einer *loxP* Sequenz.

Konstrukt	Aktivierungselement	Gewebespezifische Exzisionseinheit
pPollenEx1	<i>loxP</i> : GmHsp17.5E : Cre : OCS : <i>loxP</i>	ZmMADS2 : <i>loxP</i> : FLP : E9
pPollenEx2	<i>FRT</i> : GmHsp17.5E : FLP : OCS : <i>FRT</i>	ZmMADS2 : <i>FRT</i> : Cre : E9

Die Funktionalität der Konstrukte wurde durch *in vitro* Rekombination überprüft. Hierbei wurden die Konstrukte mit der Cre Rekombinase (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) aus dem Creator™ DNA Cloning Kit behandelt. 500 ng des jeweiligen Konstrukts wurden mit 0,5 µl Cre Rekombinase nach Herstellerangaben inkubiert, anschließend wurde die Rekombinationen in einer PCR Reaktion mit den Primern FLP1 und Cre4 überprüft. Die Rekombination des Konstrukts pPollenEx2 mit der Cre Rekombinase wurde mit den Primern T1F und T1R getestet. Beide Rekombinationen zeigten nach einer Sequenzierung der PCR Produkte eine erfolgreiche und sequenzgenaue Exzision innerhalb der Konstrukte. Für die Rekombinationen mit der FLP Rekombinase wurde diese aus einer Überexpressionskultur

isoliert und 5 µl der erhaltenen Suspension anstelle der Cre Rekombinase in den Rekombinationen eingesetzt. Die erfolgreiche Exzision des Aktivierungselements in dem Konstrukt pPollenEx2 wurde mit den Primern FLP1 und FLP4, die Rekombination des Konstrukts pPollenEx1 mit der FLP Rekombinase mit den Primern T1F und T1R nachgewiesen. Auch hier konnte in den Amplifikaten eine sequenzgenaue Rekombination der Konstrukte nachgewiesen werden.

3.1.3 Integration des postulierten PME1 –Promotorsequenz

Die grundlegenden Vektoren pPollenEx1 und pPollenEx2 sollten nach ihrer Aktivierung durch einen Hitzeschock während der Pollenentwicklung zur Expression einer Rekombinase führen, die die codierenden und regulierenden Sequenzen der T-DNA aus dem Maisgenom entfernen soll. Von Prof. Dr. T. Dresselhaus (Universität Regensburg, Deutschland) wurde die PME1- Promotor Sequenz aus Mais zur Verfügung gestellt. In vorangegangenen Analysen konnte eine Expression des PME1 Gens in den weiblichen und männlichen Gametophyten sowie dem umliegenden Geweben festgestellt werden (persönliche Kommunikation, Prof. Dr. T. Dresselhaus, Universität Regensburg, Deutschland). Der Einsatz der entsprechenden PME1 Promotorsequenz würde nach der Aktivierung durch einen Hitzeschock während der gewebespezifischen Expression der zweiten Rekombinase zu einer Exzision der transgenen Sequenzen nicht nur im Pollen, sondern auch im weiblichen Gametophyten führen. Dieses sollte zu komplett transgenfreien Nachkommen dieser Linien führen. Der 322 bp große Promotorbereich, sowie der Promotorbereich und die dazugehörige 5'-UTR (455 bp) wurden in den Vektor pPollenEx2 anstelle des vorhandenen ZmMADS2 Promotors inseriert. Hierzu wurde aus dem Maisgenom der Inzuchtlinie A188 mittels der Primer PME1-SbfI-for und PME1-AvrII-rev, beziehungsweise PME1-SbfI-for und PME1-UTR-AvrII-rev die entsprechende Promotorregion amplifiziert und mit den Klonierungsschnittstellen SbfI und AvrII ausgestattet. Die Restriktion des Vektor pPollenEx2 mit den Restriktionsenzymen AvrII und SbfI führte zu einer Exzision des pollenspezifischen Promotor ZmMADS2. Nach der Restriktion des Grundvektors und der Amplifikate wurden die verschiedenen Ansätze mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente aus dem Gel isoliert und anschließend in den Grundvektor inseriert. Die Vektoren wurden als pGermlineEx1 (pPollenEx2-PME1) und

pGermlineEx2 (pPollenEx2-PMEI-UTR) bezeichnet. Die gewebespezifische Aktivität der Promotorregionen PME1 und PME1-UTR konnte im Zuge einer Diplomarbeit von Felix Eggert bestätigt werden. Hierbei wurden die entsprechenden Promotorsequenzen in einen Expressionsvektor kloniert, bei dem eine Aktivität des Promotors zu einer Expression des *uidA* Gens führt. Nach der stabilen Transformation der Konstrukte in Mais konnte dann diese in histologischen GUS-Färbungen nachgewiesen werden.

3.2 Agrobakterien vermittelte Transformation von *Zea mays*

Nachdem die Konstrukte auf Ihre Funktionalität überprüft worden waren, wurden sie in den Agrobakterienstamm LBA4404 transformiert und für die stabile Transformation von unreifen Maisembryonen eingesetzt.

3.2.1 Transformationssystem von unreifen Maisembryonen mit *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

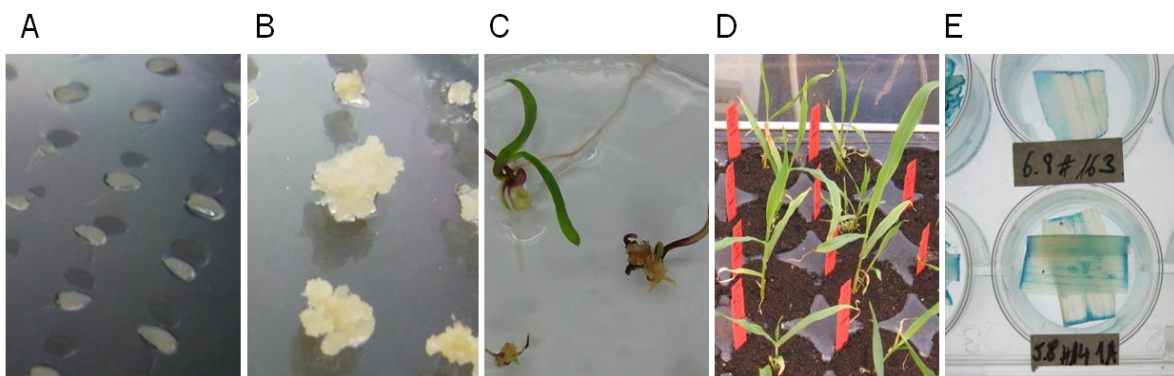


Abbildung 9: Beispiele verschiedener Stationen der Maistransformation

11 Tage alte Maisembryonen wurden mit Agrobakterien infiziert (A). Nach der erfolgreichen Kallusinduktion wurden durch die Zugabe von Glufosinat in das Medium transformierte Kalli selektiert (B). Nach der Ausbildung von Gewebestrukturen (C) konnten neue transformierte Pflanzen regeneriert werden. Nachdem die Pflanzen in Erde überführt werden konnten, wurden diese erneut durch das Besprühen mit einer BASTA[®] Lösung (250 mg/l) selektiert (D). Als weiterer Test wurde mit den Pflanzen eine GUS-Färbung durchgeführt, um falsch positive Pflanzen zu ermitteln (E).

Die Transformation der unreifen Maisembryonen wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll von Simone Amati (Universität Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden aus Kreuzungen von Hill A und Hill B Inzuchtlinien 11 Tage nach der Bestäubung die unreifen Embryonen steril aus den Kolben isoliert. Insgesamt wurden im Laufe der Transformationen 2473 Embryonen mit pPollenEx1, 2629 Embryonen mit pPollenEx2, 675 mit pGermlineEx1 und 633 Embryonen mit pGermlineEx2 transformiert. Die isolierten Embryonen wurden in Chargen von etwa 100 bis 150 Embryonen mit Agrobakterien infiziert. Nach der Inkubation des Agrobakterien Stammes LBA4404 mit dem entsprechenden Konstrukt über Nacht bis zu einer OD_{600} von 0,5 in AB-Medium wurden diese nach einigen Waschschritten mit den frisch isolierten Embryonen vereinigt. Das Gemisch wurde anschließend auf Cokultivierungsmedium ausgegossen, die überschüssige Flüssigkeit abgezogen und die mit Agrobakterien benetzten Embryonen über Nacht bei 21°C inkubiert (Abb.9A). Am nächsten Tag wurden die Embryonen gewendet und auf frisches Cokultivierungsmedium überführt. Nach einer weiteren über Nacht Inkubation bei 21°C wurden die Embryonen mit dem Scutellumgewebe nach oben auf Restingmedium transferiert. Dieses Medium soll die Entstehung von Kallusgewebe induzieren und darüber hinaus verbleibende Agrobakterien abtöten. Während einer Inkubation von einer Woche in Dunkelheit bei 26°C wurden auskeimende Embryonen entfernt und das verbleibende vitale Scutellumgewebe, das erste Anzeichen von Kallusbildung zeigte, auf Selektionsmedium I überführt. Das Selektionsmedium I wurde im Vergleich zum ursprünglichen Protokoll dahingehend modifiziert, dass neben der weiteren Selektion gegen Agrobakterien und der ersten Selektion der Gewebe mit Glufosinat (17 μ M) auch weiterhin eine Induktion der Kallusbildung mittels 2,4 D (6,5 μ M) durchgeführt wurde. Die Inkubation bei 28°C in Dunkelheit dauerte mindestens zwei Wochen mit wöchentlichem Umsetzen der sich entwickelnden Typ II Kalli auf neues Medium und der sorgfältigen Entfernung von absterbendem Gewebe oder des Typ I Kallus. Vitale Kallusstrukturen wurden nach dieser Prozedur auf Selektionsmedium II subkultiviert, das einen höheren Anteil an Glufosinat (34 μ M) enthielt und für weitere 4 Wochen bei 28°C in Dunkelheit inkubiert (Abb.9B). Dabei wurde alle zwei Wochen das Medium erneuert und absterbende Strukturen entfernt. Aus den Transformationsansätzen konnten mit dem Vektor pPollenEx1 710 Kalli, mit dem Vektor pPollenEx2 787 Kalli erhalten werden, welches einer Erfolgsquote von 28,7 % beziehungsweise 29,9 % entspricht. Die Transformationen mit den Vektoren pGermlineEx1

und pGermlineEx2 führten zu 142 und 100 sich entwickelnden Kalli, also einer Rate von 21,0 % und 15,8 %. Im Unterschied zu dem ursprünglichen Protokoll, das eine Inkubation auf Regenerationsmedium in Dunkelheit bei 28°C vorsah, wurden in diesem Ansatz die Kalli solange auf Selektionsmedium II inkubiert, bis sie erste Gewebestrukturen ausbildeten. Erst dann wurden sie auf Regenerationsmedium transferiert und bei 26°C in eine Lichtkammer gestellt, um Sprosse und Wurzeln auszubilden. Während die erste Inkubationsphase noch auf Platten durchgeführt wurde (Abb.9C), wurden sich entwickelnde Sprosse aus den Kallusgeweben in Magentadosen überführt, damit ein relativ ungestörtes Längenwachstum gewährleistet werden konnte. Nach etwa zwei bis drei Wochen konnten Regenerate, die über einen ausreichenden Spross und Bewurzelung verfügten in Aussaaterde gepflanzt werden und ins Gewächshaus überführt werden. Aus der *in vitro* Kultur von transformierten Embryonen mit pPollenEx1 konnten 221 Regenerate in das Gewächshaus überführt werden. Dieses entspricht etwa 8,9 % der eingesetzten Embryonen. Bei den anderen Transformationsexperimenten konnten für das Konstrukt pPollenEx2 371 (14,1 %), für pGermlineEx1 107 (15,8 %) und für pGermlineEx2 84 (13,3 %) Regenerate erfolgreich in Erde gepflanzt werden. Zur Akklimatisierung der *in-vitro* Kultur Pflänzchen an das Gewächshaus, wurden sie die erste Woche durch eine Haube vor dem Austrocknen geschützt. Nachdem sie im wöchentlichen Abstand dreimal mit einer BASTA[®] Lösung (250 mg/l) selektiert wurden, verblieben für das pPollenEx1 Konstrukt noch 165 Pflanzenlinien. Für das Konstrukt pPollenEx2 überstanden 144 Linien, für die Konstrukte pGermlineEx1 und pGermlineEx2 75 beziehungsweise 70 Linien diesen Selektionsschritt (Abb.9D). Da die Konstrukte das Reportergen *uidA* besaßen, konnte die Effektivität der Selektionsschritte und die Expression der Vektorbestandteile in einem physiologischen GUS-Test überprüft werden. Hierbei konnten bei 135 Linien das *uidA* Gen des Vektors pPollenEx1 histochemisch nachgewiesen werden (Abb.9E). Dieses entspricht einer Transformationseffizienz von 5,5 % gemessen an der Gesamtsumme der eingesetzten Embryonen. Für den Vektor pPollenEx2 konnte in 133 Fällen histologisch das *uidA* Gen nachgewiesen werden, das einer Transformationseffizienz von 5,1 % entspricht. 70 bzw. 60 Linien, die mit dem Vektor pGermlineEx1 und pGermlineEx2 transformiert wurden zeigten nach der Transformation eine positive GUS-Färbung. Dieses entspricht einer Transformationseffizienz von 10,4 % und 9,5 %. Insgesamt konnten 398 Linien aus den verschiedenen Transformationen regeneriert werden.

	Embryonen	Kalli	Regenerate	Pflanzenlinien	GUS positiv
pPollenEx1	2473	710	221	165	135 (5,5 %)
pPollenEx2	2629	787	371	144	133 (5,1 %)
pGermlineEx1	675	142	107	75	70 (10,4 %)
pGermlineEx2	633	100	84	70	60 (9,5 %)

3.2.2 Molekulare Analyse der T₀-Generation

Von GUS positiven Pflanzen wurde gDNA isoliert. Zunächst sollte überprüft werden, ob es sich bei den Regeneraten um unabhängige transgene Pflanzen handelt oder einzelne Regenerate klonalen Ursprungs sind. Für die molekularen Analysen wurden mit Digoxigenin-11-dUTP markierte Sonden erstellt, die Abschnitte der zweiten Rekombinase enthielten, da diese am äußeren 3'-Bereich der Konstrukte liegen. Für die molekularen Analysen der pPollenEx1 Pflanzenlinien wurden mit den Primern dig-FLP-for und dig-FLP-rev ein 666 bp langer Bereich der FLP Rekombinase nach Herstellerangaben (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) amplifiziert. Zur Kontrolle der Integration des Digoxigenin-11-dUTPs wurde parallel eine normale Amplifikation des Bereiches durchgeführt. Die Inkorporation der markierten Nukleotide sollte während der Gelelektrophorese eine deutliche Verschiebung der Bande in einen höher molekularen Bereich zeigen als der Vergleich mit einer nicht markierten Bande. Für die Analyse der Pflanzen mit den Konstrukten pPollenEx2, pGermlineEx1 oder pGermlineEx2 wurde ein 658 bp großer Bereich der *cre* Rekombinase gewählt und dieser mit der Primerkombination dig-CRE-for und dig-CRE-rev markiert. Die hergestellten Sonden wurden generell in einer Konzentration von 7,5 bis 10 ng/ml angesetzt. Die ersten molekularen Analysen sollten die vollständige Integration des Konstruktes im pflanzlichen Genom bestätigen und darüber hinaus eine ungefähre Abschätzung der Anzahl von Integrationsereignissen in den einzelnen Linien ermöglichen. Dieses war nötig, da bei den geplanten Experimenten, im Falle von Mehrfachintegrationen, durch die Rekombinationen das Risiko von intramolekularen Rekombinationen bestand. Hierfür wurde je 20 µg der isolierten gDNA der einzelnen Linien mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und danach in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

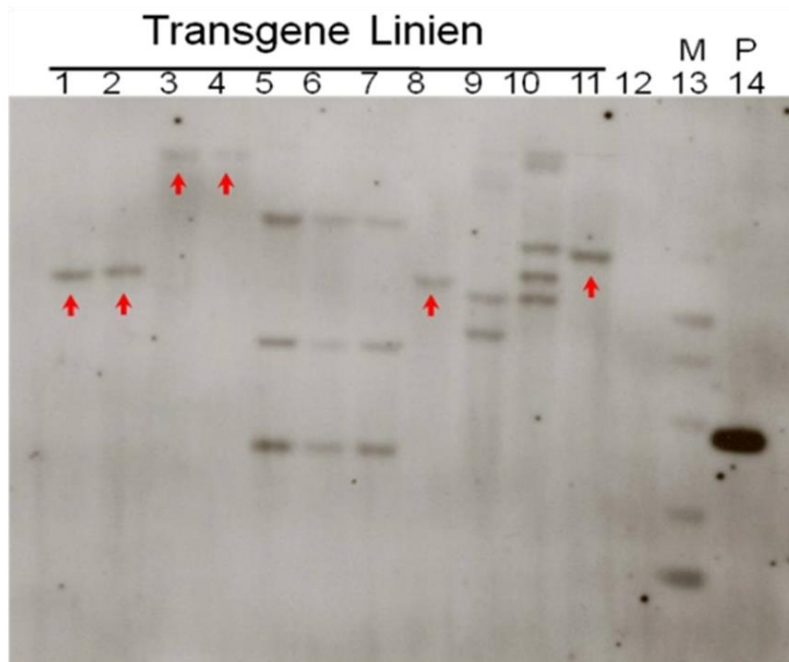


Abbildung 10: Southern Blot Analyse von Pflanzen mit dem Konstrukt pPollenEx1

Nach der positiven Selektion durch eine GUS-Färbung wurde eine molekulare Analyse der Pflanzen durchgeführt, um unabhängige und klonale transgene Pflanzen zu identifizieren, sowie die Anzahl integrierter T-DNAs bestimmen zu können. Hierfür wurde gDNA aus den Regeneraten isoliert und davon jeweils 20 µg mit BamHI restringiert. Nach einer Größenauftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden diese auf positiv geladene Nylonmembran geblottet und mit einer Dig-markierten FLP-Sonde (666 bp) hybridisiert. Die Anzahl an

nachgewiesenen Fragmenten gibt einen Hinweis auf die Anzahl an Integrationen im Genom, während eine identische Fragmentgröße ein Hinweis für eine Klonalität der Linien darstellt. Die hier dargestellte Hybridisierung zeigt in den Spuren 1 bis 11 die Auftrennung der gDNA Restriktionen von unterschiedlichen Pflanzen, in Spur 13 den Marker GeneRuler™ 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, Deutschland) und in Spur 14 DNA des pPollenEx1 Vektors als positive Kontrolle des Experiments. In den Spuren 1, 2, 3, 4 sowie 8 und 11 wurde eine Einzelintegration postuliert, wobei die Pflanzen der Spuren 1 und 2, die Pflanzen der Spuren 3 und 4 sowie die Pflanzen der Spuren 5, 6 und 7 untereinander so ähnlich sind, dass hier von einer Klonalität ausgegangen wurde. Spur 1 = Pflanze #81, Spur 2 = Pflanze #83, Spur 3 = Pflanze #87, Spur 4 = Pflanze #89, Spur 5 = Pflanze #116, Spur 6 = Pflanze #117, Spur 7 = Pflanze #118 Spur 8 = Pflanze #139, Spur 9 = Pflanze #140, Spur 10 = Pflanze #143, Spur 11 = Pflanze #144.

Nach dem Transfer der DNA-Fragmente mittels Kapillar-Blot auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden die Membranen mit der entsprechenden Sonde (pPollenEx1 Linien mit der FLP-Sonde, pPollenEx2, pGermlineEx1 und pGermlineEx2 mit der Cre-Sonde) bei 48°C über Nacht in einem Rotationsofen hybridisiert. Das folgende Southern Blot Experiment (Abb.10) zeigte bei der Auswertung der verschiedenen Banden sowohl Einzelintegrationen wie zum Beispiel in Spur 1-4 und 8, wie auch diverse Mehrfachintegrationen von T-DNA in Spur 5-7, 9 und 10. In diesem Experiment wurden verschiedene T₀ Linien des Konstrukts pPollenEx1 mit einer FLP-Sonde detektiert (Spur 1 = Pflanze #81, Spur 2 = Pflanze #83, Spur 3 = Pflanze #87, Spur 4 = Pflanze #89, Spur 5 = Pflanze #116, Spur 6 = Pflanze #117, Spur 7 = Pflanze #118 Spur 8 = Pflanze #139, Spur 9 =

Pflanze #140, Spur 10 = Pflanze #143, Spur 11 = Pflanze #144.). Als positive Kontrolle des Southern Blot Experiments wurde das pPollenEx1 Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoRV behandelt, das ein Fragment der Größe von 3,4 kbp herausschneiden sollte (Spur 14). Für die Restriktion der genomischen DNA wurde BamHI eingesetzt, das einmal vor dem zu detektierenden Fragment und ein weiteres Mal erst im pflanzlichen Genom schnitt. Die Größe des detektierten Fragmentes entsteht demnach aus einem Konstruktanteil von 2,8 kbp und dem Anteil der genomischen DNA, definiert durch das Auftreten der nächsten BamHI Schnittstelle. In diesem Experiment konnten nicht nur einige wahrscheinliche Einzelintegrate bestimmt werden, sondern auch für mehrere Linien deren klonaler Ursprung ermittelt werden (Spur 5 bis 7). Um Saatgut aus den einzelnen Pflanzen zu gewinnen, wurden sich entwickelnde Kolben wiederholt mit Pollen der Inzuchtlinie A188 bestäubt. Wenn möglich wurden für die weiteren Experimente Einzelintegrationslinien verwendet, um die angestrebten Auskreuzungsexperimente auswerten zu können. Das so entstandene Saatgut sollte daher hemizygot für die transgenen Eigenschaften sein und im Falle eines erfolglosen Experimentes in einem Verhältnis von 1:2 an die nächste Generation weitergegeben werden.

3.3 Etablierung eines Systems zur Aktivierung der Konstrukte mittels Hitzeschock

Da die Erfahrungen mit der Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors alleine auf Daten aus Pappelkulturen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) beruhten, wurde ein Protokoll für die Aktivierung mittels Hitzeschock erstellt. Dabei wurde zunächst die Transkription und Translation der Cre Rekombinase während der Hitzeapplikation verifiziert. Für diese Versuchsreihe wurde Saatgut der Einzelintegrationslinie pPollenEx1-237 genutzt, die sich durch eine besonders hohe Nachkommenschaft in der T₁ auszeichnete, bei denen schon in Vorversuchen auf genomischer Ebene eine Rekombination des Konstrukts nach Hitzeeinwirkung nachgewiesen werden konnte.

3.3.1 Nachweis der hitzeinduzierten Transkription der Cre-Rekombinase

Nach der Aussaat der Linien pPollenEx1-237 wurden zwei Wochen alte Pflanzen einem histochemischen GUS-Test unterzogen. Transgene Nachkommen wurden zunächst verschiedenen Hitzeregimen ausgesetzt. Hierbei wurden Pflanzen für zwei Stunden bei 37°C, 40°C, 42°C oder 45°C inkubiert, aus dem Blattgewebe die RNA isoliert und anschließend mittels RT-PCR die Transkription der Cre Rekombinase mit den Primern dig-CRE-for und RT-CRE-rev nachgewiesen (Abb.11A). Bei einer Transkription der Cre Rekombinase sollte nach der RT-PCR eine 450 bp Bande nachweisbar sein.

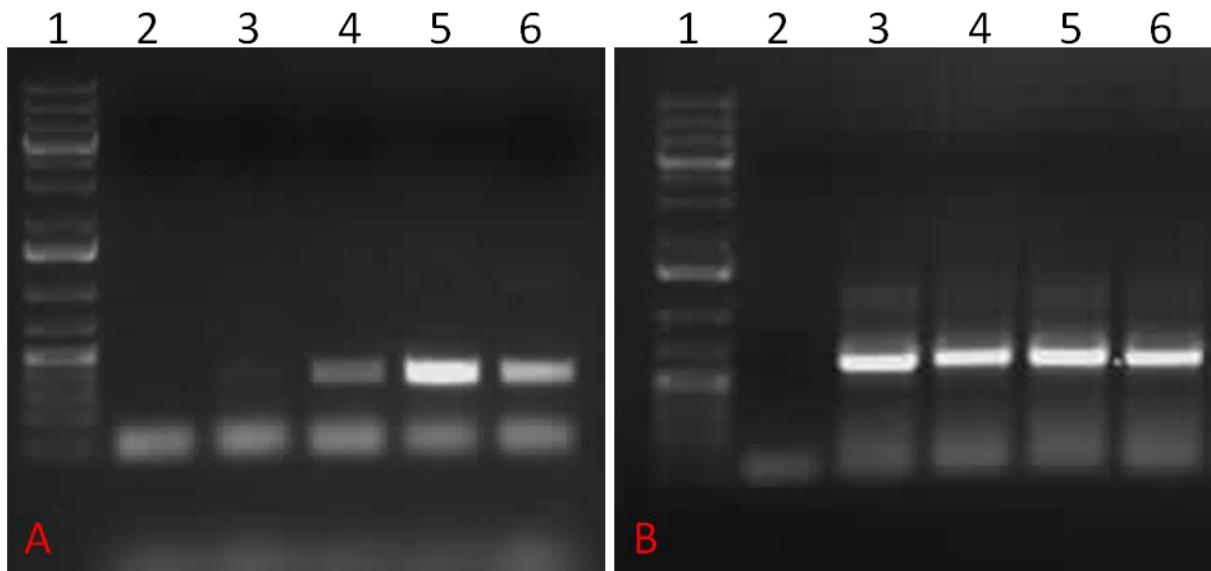


Abbildung 11: Nachweis der hitzeinduzierten Expression der Cre-Rekombinase

14 Tage alte Pflanzen der Linie pPollenEx1-237 wurden für zwei Stunden unterschiedlichen Hitzebehandlungen von 37°C bis 45°C (Spur 3-6 Bild A und B) ausgesetzt. Anschließend wurde RNA aus den Pflanzen isoliert und mittels RT-PCR die Transkription des *cre*-Gens mit Hilfe der Primer (dig-CRE-for und RT-CRE-rev) nachgewiesen (A). Parallel dazu wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase als interne Kontrolle der Reaktion verifiziert (B). Ab einer Temperatur von 37°C (Bild A Spur 3) konnte bereits eine schwache Expression des *cre*-Gens gezeigt werden. Die Behandlungen bei 40°C bis 45°C zeigten eine deutliche Expression der Cre-Rekombinase (Bild A Spur 4-6). Die vermeintlich stärkste Expression wurde bei 42°C (Bild A Spur 5) festgestellt. Die Wasserkontrollen zeigten keine Kontamination der Reaktionen (Spur 2 Bild A und B) in Spur 1 befindet sich der GeneRuler™ 1kb Plus Marker (Thermo Fisher Scientific Inc., St.Leon-Rot, Deutschland).

Im Falle einer residualen gDNA Kontamination wurde die Primerkombination so gewählt, dass die Amplifikation von Vektorelementen auch das STLS-1 Intron erfasst. Dieses würde die erhaltene Bande um 200 bp von 450 bp auf 650 bp verschieben. Als Kontrolle der cDNA

Synthese wurde mit den Primern GAP1 und GAP2 die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase als interne Positivkontrolle des Versuches genutzt. Bei erfolgreicher cDNA Synthese aus der isolierten RNA sollte nach der Amplifikation mittels PCR ein etwa 600 bp großes Fragment nachweisbar sein (Abb.10B). Die Experimente zeigen schon ab 37°C eine geringe Expression der cre Rekombinase (Abb.10A: Spur 3). Bei Temperaturen ab 40°C (Abb.11A: Spur 4-6) konnte eine deutliche Expression der Cre Rekombinase in dem Blattmaterial der Pflanzen nachgewiesen werden. Da bei einer 45°C Inkubation aber schon erste stressbedingte Nekrosen an den Pflanzen zu beobachten waren, wurden die weiteren Versuche zur Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors bei 42°C durchgeführt. Hier war die Transkription der Cre Rekombinase als gesichert anzusehen, wobei noch keine sichtbaren Schäden bei den Pflanzen zu beobachten waren. Nachdem die Rahmenbedingungen für die Initialisierung der Transkription ermittelt waren, wurde versucht die Dauer der Promotoraktivität einzugrenzen. Für dieses Experiment wurden erneut zwei Wochen alte Nachkommen der Linie pPollenEx1-237 genutzt und einer Hitzebehandlung von 42°C für 2 Stunden ausgesetzt..

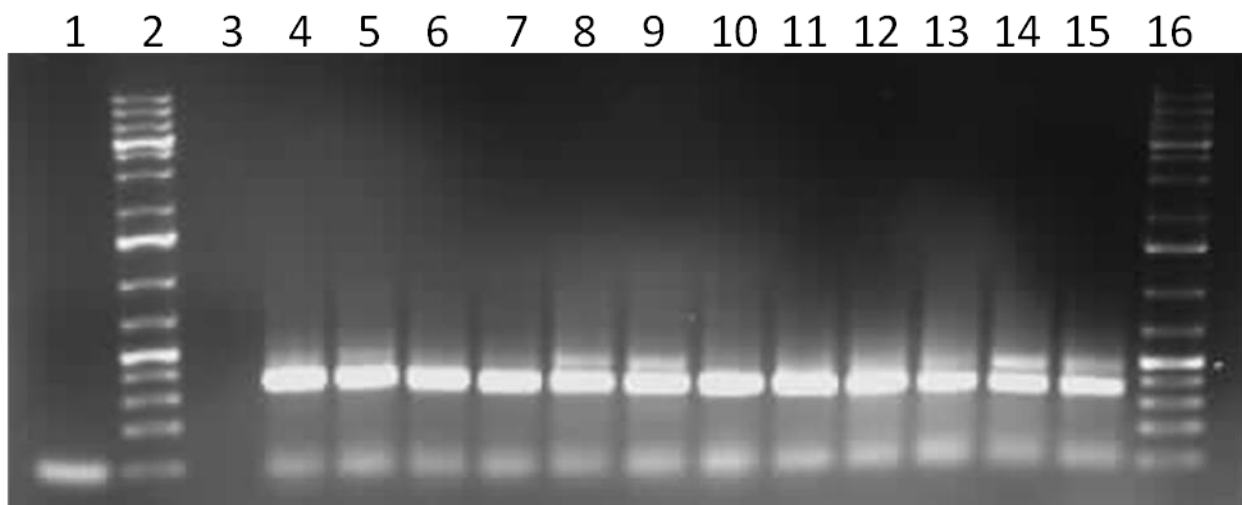


Abbildung 12: RT-PCR zum Nachweis der cre Expression nach einem Hitzeschock

Nachdem die Rahmenbedingungen für eine Aktivierung des GmHSP17.5E Promotor in Mais auf eine zwei stündige Inkubation bei 42°C festgelegt worden waren, wurde versucht, die Dauer der Promotoraktivität abzuschätzen. Hierfür wurden 14 Tage alte Maispflanzen der Linie pPollenEx1-237 einer Hitzebehandlung (2 Stunden bei 42°C) unterzogen. Proben wurden vor, direkt nach dem Hitzeschock und alle weiteren zwei Stunden genommen. Aus der RNA der unterschiedlichen Proben wurde mit den Primern dig-CRE-for und RT-Cre-rev versucht, das Transkript der cre-Rekombinase nachzuweisen. Während vor dem Hitzeschock (Spur 1) noch keine cre-RNA nachweisbar war, konnte sowohl direkt nach dem Hitzeschock (Spur4) als auch nach 22 Stunden Regeneration die Expression der Cre-Rekombinase gezeigt werden. In Spur 2 und 16 befindet sich der GeneRuler™ 1kb Plus Marker (Thermo Fisher Scientific Inc., St.Leon-Rot, Deutschland)

Um die Dauer der Aktivierung abschätzen zu können, wurden vor, direkt nach dem Hitzeschock, sowie alle zwei Stunden Blattproben genommen, aus denen RNA isoliert wurde. Um eine Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors durch das wiederholte Entfernen von Blattmaterial ausschließen zu können, wurde für jede RNA Isolation eine separate Pflanze genutzt. Nach der Isolation von RNA wurde, wie in den vorangegangenen Versuchen, mit den Primern dig-CRE-for und RT-CRE-rev die Expression der Cre Rekombinase in dem Gewebe nachgewiesen. Die Größe des zu erwartenden Fragments betrug etwa 450 bp, wobei eine residuale Verunreinigung mit genomischer DNA zu einem 650 bp großen Amplifikat führen würde. Während vor dem Hitzeschock noch keine Expression (Abb.12: Spur 1) feststellbar war, konnte schon direkt nach dem Hitzeschock eine hohe Expression der Cre Rekombinase festgestellt werden, die auch 22 Stunden nach dem Hitzeschock (Abb.12: Spur 15) noch nachweisbar war. Abschließend konnte allerdings nicht ermittelt werden wie lange der GmHSP17.5E Promotor aktiv ist

3.3.2 Nachweis der hitzeinduzierten Translation der Cre Rekombinase

Nachdem die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors durch einen Hitzeschock und die folgende Transkription der Cre Rekombinase nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Translation der cre Rekombinase mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers untersucht. Für dieses Experiment wurden erneut Pflanzen der Linien pPollenEx1-237 angezogen und für zwei Stunden bei 42°C inkubiert. Da die RT-PCR Ergebnisse eine lang anhaltende Expression der Cre Rekombinase vorhersagten, wurden sowohl vor und direkt nach dem Hitzeschock Proben genommen, bis zu einer Regenerationszeit von 24 Stunden. Danach wurden daraus die Proteine isoliert und 20 µg Gesamtprotein in einer 12,5 % Tris-Glycerin SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Darmstadt, Deutschland) mittels halbtrockenem Western Blot transferiert und fixiert. Die Detektion wurde mit einem zweiten Antikörper (Monoclonal Anti-Rabbit IgG (γ-chain-specific)-Alkaline Phosphatase, Sigma, Saint Lois, USA) und dem Substrat CSPD durchgeführt. Die erfolgreiche Expression der Cre Rekombinase sollte zu

einem Signal bei etwa 38 kDa führen, wobei die Dimerbildung der Cre Rekombinase unter Umständen zu einer zweiten Hybridisierung im Bereich von etwa 75 kDa führen könnte. Die Auswertung des Western Blot Experiments (Abb.13) zeigte keine nachweisbare Expression der Cre Rekombinase vor der Hitzeschockbehandlung (Abb.13: Spur2).

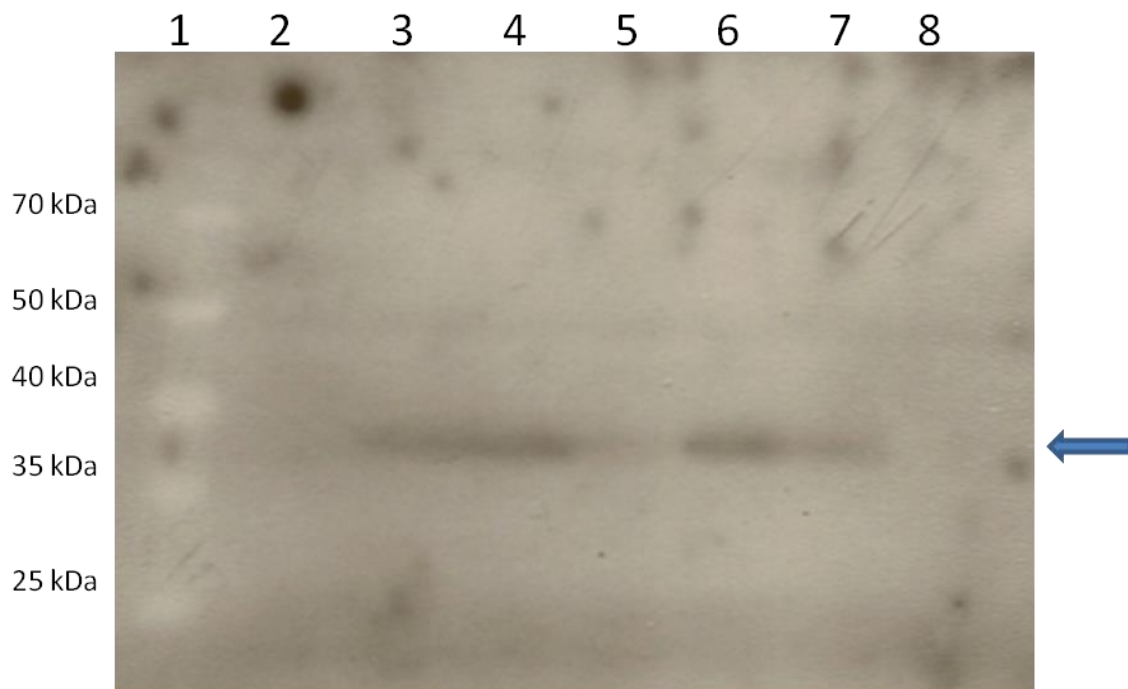


Abbildung 13: Western Blot Analyse der Cre-Rekombinase nach einem Hitzeschock

Die Translation der *cre*-RNA wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers im Gesamtprotein nachgewiesen. Hierfür wurden Pflanzen der Linie pPollenEx1-237 für 2 Stunden bei 42°C einer Hitzebehandlung unterzogen. Vor, direkt nach der Behandlung und bis nach 24 Stunden Regeneration wurden Blattproben genommen und das Gesamtprotein aus ihnen isoliert. 20 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die CRE-Rekombinase durch ein Western Blot Experiment nachgewiesen. In Spur 1 befindet sich die Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. Spur 2 zeigt keine nachweisbare CRE-Rekombinase vor der Hitzebehandlung. Direkt nach der Hitzebehandlung (Spur 3), nach zwei Stunden (Spur4), acht Stunden (Spur 5), 16 Stunden (Spur 6) und 20 Stunden (Spur 7) Regeneration ist die Cre-Rekombinase nachweisbar. Nach 24 Stunden Regeneration (Spur 8) war kein Nachweis des Proteins mehr möglich.

Dieses wurde auch schon in den vorangegangenen RT-PCR Analysen (Abb.12: Spur 1) bestätigt. Direkt nach dem Hitzeschock (Abb.13: Spur 3) konnte das Cre Protein nachgewiesen werden. Die Cre Rekombinase war sogar noch 20 Stunden nach der Hitzebehandlung nachweisbar (Abb.13: Spur 7), wenn auch nur schwach, im Vergleich zum Maximum. Nach 24 Stunden Regenerationszeit war im Western Blot Experiment keine Cre Rekombinase mehr nachweisbar (Abb.13: Spur 8), obwohl die RNA Analysen nach 22 Stunden noch eine deutliche Transkription aufzeigten (Abb.12: Spur 15). Dieses lässt auf eine Regulation in der Translation der synthetisierten RNA schließen.

3.3.3 Nachweis der hitzeinduzierten Rekombination der Konstrukte

Nachdem die Expression der Cre Rekombinase nach einem Hitzeschock verifiziert worden ist, wurden zwei Wochen alte Pflanzen der Linien pPollenEx1 und pPollenEx2 einem Hitzeschock von 2 Stunden bei 42°C ausgesetzt. Nach einer Regenerationszeit von 24 Stunden wurde gDNA aus den Pflanzen extrahiert und die Exzision der Aktivierungselemente, bestehend aus dem Hitzeschockpromotor GmHSP17.5E und der jeweiligen *cre* beziehungsweise *flp* Rekombinase, mittels eines Southern Blot Experimentes untersucht. Hierzu wurde die erhaltene gDNA mit den Restriktionsenzymen SfiI und EcoRI gespalten (vergleiche Abb.14) und anschließend die entstehenden Fragmente durch Elektrophorese in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

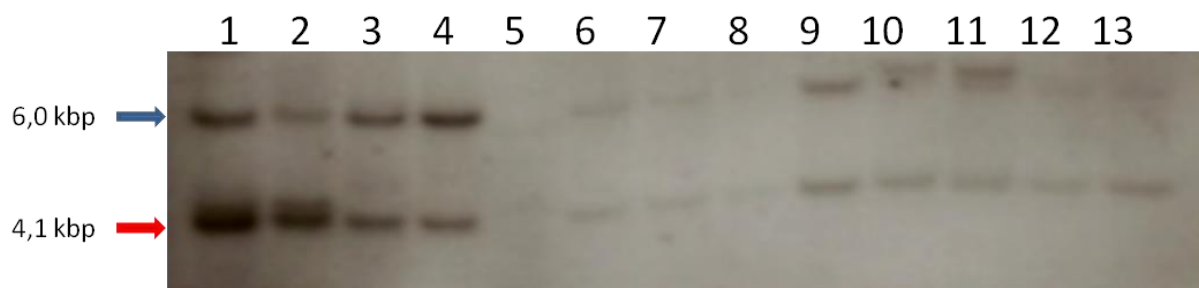


Abbildung 14: Untersuchung zur Exzision der HSP-*cre*-OCS Genkassette nach einem Hitzeschock in 14

Tage alten Maispflanzen

Nach der Etablierung der grundlegenden Parameter für eine Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors in Mais wurden 14 Tage alte Maispflanzen von verschiedenen Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 für zwei Stunden bei 42°C inkubiert. Nach einer Regeneration von 24 Stunden wurde aus Blattmaterial der Pflanzen gDNA isoliert und mit den Enzymen SfiI und EcoRI behandelt. Nach der Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese und dem anschließenden Transfer auf eine Nylonmembran wurden die entstandenen Fragmente mit Hilfe einer Digoxigenin-11-dUTP markierten *flp*-Sonde nachgewiesen. Das ursprüngliche Konstrukt sollte durch ein Fragment von etwa 6,0 kbp nachweisbar sein, während ein Konstrukt nach der erfolgreichen Exzision durch ein etwa 4,1 kbp großes Fragment definiert wäre. Die Analyse der Linien pPollenEx1-81 HS1 #1, 2 (Spur 1 und 2), pPollenEx1-105 HS1 #1, 2 (Spur 3 und 4), pPollenEx1-234 HS1 #2, 5 (Spur 6 und 7), pPollenEx1-127 HS1 #2, 3 (Spur 8 und 9), pPollenEx1-106 HS1 #7,10 (Spur 10 und 11) und pPollenEx1-201 HS1 #1, 2 (Spur 12 und 13) zeigen alle einen chimären Genotypen mit teilweise unveränderten (6,0 kbp Fragment) und teilweise rekombiniertem (4,1 kbp Fragment) Konstrukt. In Spur 5 befindet sich der Marker GeneRuler™ 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, Deutschland)

Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran und der Hybridisierung mit einer spezifischen Digoxigenin-11-dUTP markierten *cre*- beziehungsweise *flp*-Sonde wurde die zweite Rekombinase im Konstrukt nachgewiesen. Für die Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1

wurde die *flp*-Sonde genutzt, für Linien mit dem Konstrukt pPollenEx2 die *cre*-Sonde. Das erwartete Fragment sollte ohne eine Rekombination eine Größe von etwa 6,0 kbp besitzen, während eine erfolgreiche Exzision des Aktivierungselements zu einem kleineren Fragment führt. Dieses sollte in Falle des Vektors pPollenEx1 etwa eine Größe von 4,1 kbp aufweisen, für Pflanzen mit dem Konstrukt pPollenEx2 etwa 3,8 kbp. Die Auswertung der Hybridisierungen von verschiedenen Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 zeigte aber ausschließlich Linien (Abb.14) mit chimärem Charakter. In den Linien konnte zwar die Exzision nachgewiesen werden, aber auch ein hoher Anteil des ursprünglichen, nicht-rekombinierten Konstrukts. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Aktivierung der einzelnen Linien in zwei Wochen alten Pflanzen eingestellt und eine neue Methode zur Aktivierung der Konstrukte etabliert. Die Expression der Rekombinase konnte nur in den Blättern und in den ersten zwei Blattscheiden nachgewiesen werden und auch eine verlängerte Inkubation von 48 Stunden bei 42°C führte nicht zu einer nachweisbaren Expression der Cre Rekombinase in inneren Gewebeteilen. Da die innen liegenden Keimbahnen der Maispflanzen in diesem Stadium zu gut gegen Hitzeeinwirkungen geschützt waren, musste die systemische Aktivierung der Konstrukte zu einem anderen Zeitpunkt stattfinden. Um eine Aktivierung des Konstrukts in allen Gewebeteilen der Pflanze zu gewährleisten, wurden für die Hitzeschockbehandlung keimende Maiskörner eingesetzt. Dieses sollte eine vollständige Durchdringung der Hitze in den Keimling ermöglichen. Da die Analyse der Hitzebehandlung in den Blättern eine unvollständige Rekombination zeigte, wurde eine Sequenz von Hitzebehandlungen verwendet, um durch wiederholte Expression der Rekombinase eine vollständige Exzision der Aktivierungselemente zu erhalten. Dabei wurden 10 Körner pro Linie mit Leitungswasser überschichtet und über Nacht bei 4°C gewässert. Nach einem Spülen mit 70 % Ethanol wurden sie mit 2 % NaOHCl/ 0,1 % Mucosol-Lösung für 20 min desinfiziert und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Körner wurden daraufhin zwischen zwei in Wasser getränkten Vliespapieren in Petrischalen gebettet, diese mit Nescofim® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verschlossen und für zwei Tage bei 21 °C gelagert. Während dieser Ruhephase sollten die Körner beginnen zu keimen, während eine Sequenz von vier aufeinanderfolgenden Hitzeschockbehandlungen verwendet wurde, um in den sich entwickelnden Geweben eine vollständige Aktivierung der Konstrukte zu gewährleisten. Für die Hitzeaktivierung wurden die Petrischalen für sechs Stunden bei 42°C in einer Lichtkammer inkubiert, gefolgt von einer Regeneration bei 21°C für 18

Stunden. Danach wurden die Keimlinge in Erde gepflanzt und zwei Tage später mittels GUS-Färbung die transgenen Keimlinge detektiert. Nach einer Wachstumsphase von einer Woche wurde aus den Pflanzen gDNA extrahiert und der Erfolg der Hitzebehandlung mittels eines Southern Blot Experimentes überprüft (Abb.15). Aus der Vielzahl von transgenen Linien wurden für die Hitzeschockaktivierung hauptsächlich Linien verwendet, die in den vorangegangenen T₀ Analysen (siehe 3.2.2 Erstanalyse der T₀ Pflanzen) potentielle Einzelintegration und eine hohe Anzahl an Nachkommenschaft zeigten. Es wurden in mehreren Ansätzen Nachkommen von insgesamt 54 Linien einer Hitzebehandlung ausgesetzt, davon 16 Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1, 14 Linien des Konstrukts pPollenEx2 und je 12 Linien der Konstrukte pGermlineEx1 und pGermlineEx2. Der Nachweis der Konstruktaktivierung (Abb.15) ergab trotz der aufwendigen Aktivierungsprozedur sowohl Linien und Pflanzen die keine erkennbare Aktivierung zeigten, als auch Linien und Pflanzen mit chimärem Charakter. Hierbei war zu beobachten, dass zwar einige Linien sich generell besser oder schlechter aktivieren ließen, trotzdem konnten aber auch innerhalb einer Linie deutliche Unterschiede auftreten. Abbildung 15 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Analyse des Hitzeschocks von Nachkommen verschiedener pPollenEx2 Linien. Als Kontrolle wurde gDNA einer nicht induzierten Pflanze (Abb.15: Linie pPollenEx2-341 T₀, Spur 1) parallel mit SfiI und EcoRI restringiert und aufgetrennt und zeigt wie erwartet ein Hybridisierungssignal bei etwa 6,0 kbp. Links neben dem Marker wurden jeweils gDNA von drei Nachkommen einer pPollenEx2 Linien nach der Hitzebehandlung und positivem GUS-Test mit SfiI und EcoRI verdaut. Die Spuren 3-5 zeigen die Nachkommen der Linien pPollenEx2-289, die alle ein deutliches Hybridisierungssignal bei etwa 6,0 kbp zeigen, das dem unveränderten Konstrukt entspricht. Dieses bedeutet, dass der Versuch, eine Exzision mittels Hitzeschock zu induzieren in diesen Nachkommen nicht erfolgreich war. In den Spuren 6 bis 8 sind die Nachkommen der Linie pPollenEx2-329, welche alle keine Hybridisierung mehr bei etwa 6,0 kbp aufweisen, dafür aber ein Signal bei 3,8 kbp. Dieses Signal entspricht dem erwarteten Signal bei einer erfolgreichen Exzision im pPollenEx2 Konstrukt.

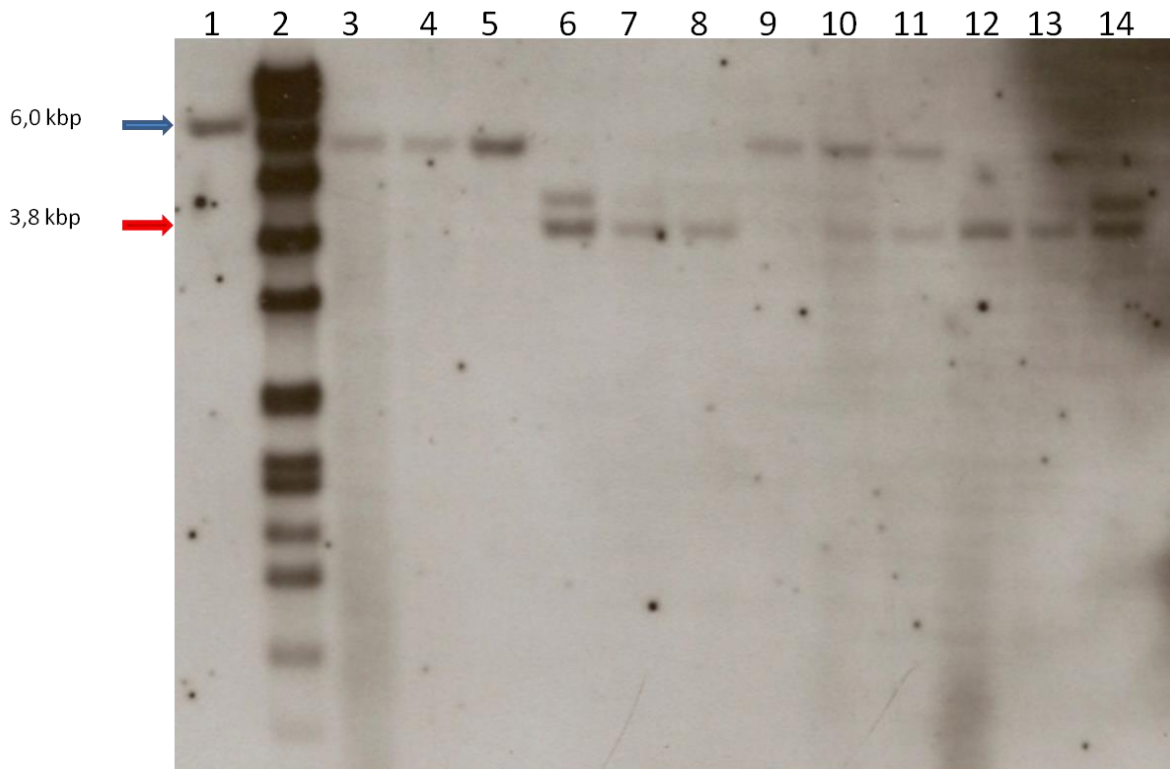


Abbildung 15: Untersuchung zur Exzision der HSP-cre-OCS Genkassette nach einer Hitzeschocksequenz in Maiskeimlingen in 14 Tage alten Maispflanzen

Nach einer vierfachen Hitzebehandlung (4x 6 Stunden bei 42°C und 18 Stunden bei 22°C) von Nachkommen verschiedener pPollenEx2 Linien wurden durch einen GUS-Test transgene Maiskeimlinge verifiziert. Von jeweils drei transgenen Nachkommen pro Linie wurde gDNA isoliert und je 20 µg mit den Enzymen EcoRI und SfiI behandelt. Nach der gelelektrophoretischen Trennung in einem 0,8 % Agarosegel und dem Transfer auf eine Nylonmembran wurden die entstandenen Fragmente im Southern Blot Experiment nachgewiesen. Zur Detektion diente eine 658 bp große Digoxigenin markierte *cre*-Sonde. Das unveränderte Integrat sollte zu einer Hybridisierung bei 6,0 kbp führen, während die induzierte Exzision zu einem etwa 3,8 kbp großes Fragment führt. Eine nicht induzierte Kontrolle (Spur 1) enthält gDNA der Primärtransgenen Linie pPollenEx2-341, die das erwartete Signal bei etwa 6,0 kbp zeigt. Die Spuren 3 bis 5 zeigen die Nachkommen der Linie pPollenEx2-289 HS2 1, 2 und 3 in denen trotz Hitzebehandlung kein Exzisionsfragment bei 3,8 kbp nachgewiesen werden konnte, sondern nur ein unverändertes Konstrukt mit einer Größe von etwa 6,0 kbp. Die Spuren 6 bis 8 zeigen die Nachkommen der Linie pPollenEx2-329 HS2 #1, 2 und 3 bei denen das ursprüngliche Konstrukt nicht mehr nachweisbar war, sondern nur das durch die Exzision verkleinerte Fragment bei etwa 3,8 kbp. Der Nachkomme pPollenEx2-329 HS2 #2 zeigte darüber hinaus eine weitere undefinierbare Hybridisierung bei etwa 4,5 kbp. In den Spuren 9 bis 11 befinden sich die Restriktionen der Nachkommen HS2 # 3, 4 und 5 der Linie pPollenEx2-334. Während bei der Pflanzen pPollenEx2-334 HS2 #3 nur das unveränderte Konstrukt und keine Exzision nachweisbar war, zeigten die anderen Pflanzen einen chimären Genotyp, bestehend aus unveränderten und auch aktiviertem Konstrukt. In den Spuren 12 bis 14 sind die Restriktionen der Nachkommen HS2 #1, 3 und 5 der Linie pPollenEx2-337 aufgetrennt. In diesen Pflanzen ist das unveränderte Konstrukt mit einer Fragmentgröße von etwa 6,0 kbp nicht mehr nachweisbar, was auf eine vollständige Aktivierung schließen läßt. Bei der Pflanzen pPollenEx2-337 HS2 # 5 kam es erneut zu einer Fehlhybridisierung bei etwa 4,5 kbp. Die Spur 2 zeigt den DNA Molecular Weight Marker VII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

In Spur 6 konnte darüber hinaus eine weitere Bande nachgewiesen werden, die über den erwarteten 3,8 kbp lag und etwa eine Größe von 4,5 kbp aufwies. Diese Bande konnte nach

dem Hitzeschock in verschiedenen Linien nachgewiesen werden (siehe Spur 14), ist aber nicht durch Konstruktdateien zu erklären und scheint auf ein Rekombinationsartefakt zurückzuführen zu sein. Die anderen Nachkommen der Linien pPollenEx2-329 (Spur 7 und 8) zeigen keine Hybridisierung bei 6,0 kbp und auch keine Bande bei 4,5 kbp, sondern nur eine Bande im Bereich von 3,6 kbp, das auf eine vollständige Exzision des Aktivierungselements hinweist. Die folgenden Nachkommen der Linie pPollenEx2-334 (Spur 9-11) zeigen keine oder nur schwache Aktivität der Rekombinase, das zu einem chimären Genotyp (Spur 10 und 11) führte. In diesen Nachkommen konnte sowohl das aktivierte Konstrukt als Signal bei etwa 3,6 kbp nachgewiesen werden, als auch das ursprünglich Konstrukt mit einem Signal bei etwa 6,1 kbp. Die Spuren 12 bis 14 der Abbildung 15 entsprechen der Analyse der Hitzeaktivierung von Nachkommen der Linie pPollenEx2-337. Die Pflanzen weisen eine vollständige Aktivierung des Konstrukts auf, wobei aber einer der Nachkommen (Spur 14) erneut eine Fehlhybridisierung bei 4,5 kbp zeigte. Auf diese Weise wurden alle 54 eingesetzten Linien analysiert und Nachkommen ohne vollständige Aktivierung oder mit Artefakten verworfen. Nur Pflanzen bei denen das aktivierte Konstrukt nachgewiesen werden konnte wurden für die weiteren Versuche verwendet. Insgesamt konnten von 39 Linien vollständig aktivierte Nachkommen erzeugt werden, bei denen in den Analysen keine Artefakte auftraten und nur das aktivierte Konstrukt nachgewiesen werden konnte. Von den 16 Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 konnten bei 12 Linien (75 %) Pflanzen für die Auskreuzung angezogen werden. Für das Konstrukt pPollenEx2 konnte aus den 14 eingesetzten Linien Nachkommen von 11 Linien (79 %) für die Auskreuzungsexperimente eingesetzt werden. Für die 12 Linien mit dem Konstrukt pGermlineEx1 konnten Nachkommen aus 7 Linien (58 %) erfolgreich aktiviert werden, für die 12 Linien des Konstrukts pGermlineEx2 Nachkommen aus 9 Linien (75 %).

Konstrukt	Anzahl der Linien	Linien für Hitzeschock	Linien mit vollständiger Aktivierung
pPollenEx1	135	16	12 (75 %)
pPollenEx2	133	14	11 (79 %)
pGermlineEx1	70	12	7 (58 %)
pGermlineEx2	60	12	9 (75 %)

3.4 Analyse der Auskreuzungsversuche aktivierter Pflanzenlinien

Bei Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 oder pPollenEx2 wurde versucht, die Übertragung von transgenen Sequenzen über den Pollen zu unterbinden. Bei den Konstrukten pGermlineEx1 und pGermlineEx2 sollte darüber hinaus die Weitergabe von transgenen Eigenschaften in den männlichen und weiblichen Keimzellen verhindert werden. Nach der Aktivierung der Konstrukte mittels Hitzeschock wurde deshalb durch die Exzision des Aktivierungselements ein gewebespezifischer Promotor vor die zweite Rekombinase gesetzt. Dieser war im Falle der pPollenEx Konstrukte der pollenspezifische Promotor ZmMADS2, bei dem pGermlineEx1 Konstrukt der postulierte Promotor ZmPMEI und bei dem Konstrukt pGermlineEx2 der ZmPMEI Promotor zusammen mit dem entsprechenden 5'UTR, welche beide sowohl während der Pollenentwicklung als auch in den Geweben des weiblichen Gametophyten aktiv sein sollten.

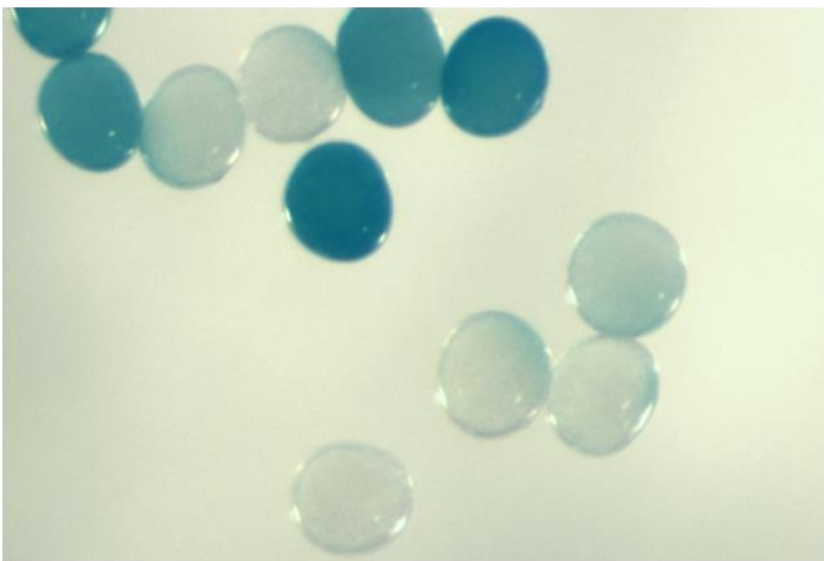


Abbildung 16: Histochemischer GUS-Test von Pollenkörnern der T1-Linie pPollenEx1-139 HS1 #3

Ein Aliquot von Pollen einer vollständig aktivierten Pflanze wurde vor dem Auskreuzen des restlichen Pollens einem GUS-Test unterzogen. Die transgenen Eigenschaften der hemizygoten Pflanzen sollten in einem Verhältnis von 1:2 in die nächste Generation vererbt werden. Die erfolgreiche Exzision der Konstruktbestandteile während der Pollenbildung sollte zu einer Verschiebung dieser Segregationsverhältnisse des transgenen Phänotyps führen und durch dieses Experiment schon vor der Auskreuzung überprüft werden. Die Pollen der Pflanze pPollenEx1-139 HS1 #3 zeigten aber keine besondere Auffälligkeit in der Segregation der transgenen Eigenschaften.

Die verschiedenen Konstrukte sollten nach ihrer Aktivierung durch einen Hitzeschock in den definierten Fortpflanzungsgeweben eine Expression der zweiten Rekombinase auslösen.

Durch die Expression der zweiten Rekombinase sollten in diesen Geweben durch Exzision sämtliche codierenden und regulierenden Konstruktbereiche aus dem Genom entfernt werden. Nur ein etwa 500 bp großer Bereich, bestehend aus den Left- und Right- Border Sequenzen der Agrobakterien Integration, eine Rekombinase Erkennungssequenz (*FRT* bei pPollenEx1 und *loxP* bei pPollenEx2, pGermlinEx1 und pGermlinEx2) sowie funktionslose Bereiche aus dem Vektorgrundgerüst sollten im pflanzlichen Genom verbleiben. Parallel zu den aktivierten Pflanzen aus den Hitzeschockbehandlungen wurden A188 Pflanzen angezogen, die für die Auskreuzungsversuche zur Verfügung stehen sollten. Die Verbreitung von transgenen Eigenschaften über den Pollen wurde durch das Bestäuben von A188 Kolben mit Pollen von jeweils einem Nachkommen der aktivierten Linien simuliert. Bei Nachkommen mit dem Konstrukte pGermlinEx1 oder pGermlinEx2 wurden zusätzlich sich entwickelnde Kolben mit Pollen von A188 Pflanzen bestäubt. Um eine möglichst hohe Anzahl an Nachkommen zu erhalten, wurden Kolben mehrfach bestäubt. Nach der Bestäubung der Kolben, wurden diese nach etwa 14 - 21 Tagen geerntet und unter sterilen Bedingungen die unreifen Embryonen isoliert. Diese wurden zum Keimen auf MS-Medium ausgelegt und eine Woche bei 26°C in einer Lichtkammer kultiviert. Nach dem Keimen der Embryonen wurden die Pflanzen in Erde gesetzt und ins Gewächshaus überführt. Nach etwa einer Woche konnten die Nachkommen durch eine histochemische GUS-Testfärbung auf die Anwesenheit des *uidA* Gens untersucht werden. Der dominant hemizygote Phänotyp des *uidA* Gens, wie er in Falle eines Einzelintegrationsereignisses vorliegt, sollte bei einer Kreuzung mit einer Pflanze der Linie A188 nach der Mendelschen Vererbung in der Hälfte der entstehenden Nachkommen nachweisbar sein. Bei einer erfolgreichen Exzision des Konstrukts aufgrund der Aktivität der zweiten Rekombinase wurde eine deutlich verminderte Weitergabe des Reportergens erwartet, bis hin zu Kreuzungen in denen bei den Nachkommen kein transgener Phänotyp mehr nachweisbar sein würde. In Voruntersuchungen wurde zusätzlich ein Aliquot des transgenen Pollens der unterschiedlichen Linien für eine GUS Färbung eingesetzt, um eventuell schon erste Anomalien in der Verteilung des GUS-Phänotyps beobachten zu können. Es konnte aber keine besondere Abweichung von der zu erwartenden mendelschen Vererbung festgestellt werden (Abb.16). Nachdem die isolierten Embryonen vom MS-Medium nach der Keimung in Erde transferiert wurden, konnte der physiologische Nachweis des *uidA* Gens durchgeführt werden. Hierfür wurde in 96er Multiwellplatten 100 µl GUS-Puffer pipettiert und von den Nachkommen einzelner

Kreuzungen Blattfragmente hinzugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde durch wiederholtes Waschen mit einer Mischung aus Eisessig und Ethanol in einem Verhältnis von 1:4 bei 37°C das Chlorophyll extrahiert. Bei Kreuzungen in denen über 90 % der Nachkommen keine positive GUS-Färbung zeigten, wurde eine erfolgreiche Exzision der Vektorbestandteile postuliert. Mit den Nachkommen von 34 der 39 aktivierten Linien konnten insgesamt 76 Auskreuzungen durchgeführt werden, bei denen 11 Auskreuzungen eine signifikante Verschiebung der Vererbungsverhältnisse aufwiesen. Bei 12 Linien des Konstrukts pPollenEx1 konnten Nachkommen erzeugt werden, die über eine erfolgreiche Aktivierung mittels Hitzeschock verfügten. Bei fünf Linien konnten wegen Problemen in der Pollenentwicklung keine erfolgreichen Kreuzungen des Pollens mit A188 Pflanzen stattfinden. Mit den verbleibenden 7 Linien konnten insgesamt 11 Auskreuzungen durchgeführt werden, von denen zwei statistisch nicht mehr als 1:2 Vererbung gewertet werden konnten. Die Kreuzung der Pflanze pPollenEx1-244 HS1 #6 führte zu 54 Wildtyp Nachkommen (67 %) und 27 Nachkommen (33 %) mit transgenem Phänotyp. Die Abbildung 17 zeigt die Auswertung einer Kreuzung zwischen Pollen der Linie pPollenEx1-139 HS1 #3 und einem Kolben der Linien A188. In dem Well H6 unten rechts befindet sich als Negativkontrolle ein Blattfragment der Linie A188. Von den insgesamt 41 Nachkommen der Kreuzung konnte nur in einem Nachkommen (2,44 %) eine positive GUS-Färbung nachgewiesen werden (Well F4). Die anderen neun Kreuzungsexperimente mit dem Konstrukt pPollenEx1 zeigten keine besonderen Auffälligkeiten im Auftreten von Wildtyp Pflanzen. Die Anteile von Pflanzen ohne *uidA* Gen lagen zwischen 46 % und 60 %. Bei den Pflanzen mit dem Konstrukt pPollenEx2 konnte mit allen 11 aktivierten Linien insgesamt 26 Kreuzungen durchgeführt werden. Hierbei zeigten sich drei auffällige Kreuzungen. Die Pflanze pPollenEx2-306 HS1 #2 erzeugte nach der Bestäubung eines A188 Kolbens aus 17 Nachkommen nur zwei *uidA*-positive Pflanzen (12 %). Die Pflanzen pPollenEx2-288 HS1 #2 zeigte bei insgesamt 65 Nachkommen nur zwanzig mit einem transgenen Phänotypen (69 %). Sämtliche 59 Nachkommen aus der Kreuzung eines A188 Kolbens mit Pollen der Pflanze pPollenEx2-284 HS1 #1 zeigten überhaupt keine transgenen Eigenschaften mehr, welches auf eine vollständige Exzision der Konstrukte während der Pollenentwicklung hindeutet.

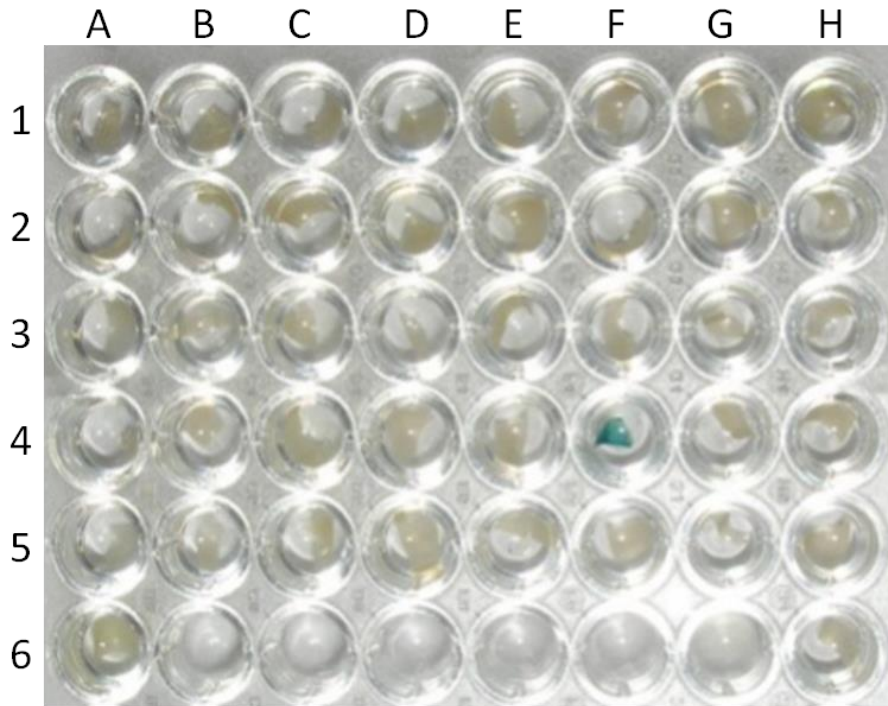


Abbildung 17: Histochemischer GUS-Test von Nachkommen der Kreuzung A188 x pPollenEx1 HS1 #3

Nachdem vorangegangene Pollenfärbungen die Exzision der Konstruktbestandteile nicht zeigen konnten, wurden weitere GUS-Färbungen mit den Nachkommen der Kreuzungsversuche durchgeführt. Etwa eine Woche nach der Embryo Rescue Prozedur konnten die keimenden Embryonen in Erde transferiert werden und eine weitere Woche später mit den entstandenen Pflanzen ein GUS-Test durchgeführt werden. Die Blattspitzen wurden in einer 96er Multi-Well-Platte mit Färbepuffer überschichtet, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit einer 1:4 Mischung von Eisessig und Ethanol entfärbt. Die erwartete Segregation des transgenen Phänotyps lag bei 1:2. Bei einer erfolgreichen Exzision des Konstrukts sollte der Anteil an Nachkommen mit transgenem Phänotyp deutlich geringer sein. In der dargestellten Auswertung der Kreuzung von Pollen der Pflanze pPollenEx1-139 HS1 #3 und einem Kolben der Linie A188 konnte aus 41 Nachkommen nur bei einem (2,24 %, Well F4) der transgene Phänotyp festgestellt werden. Die restlichen 40 Nachkommen (97,76 %) zeigten keine GUS-Aktivität. Im Well H6 befindet sich als Negativkontrolle eine Blattspitze von Hill A.

Mit den Nachkommen aus sieben vollständig aktivierten Linien des Konstrukts pGermlineEx1 konnten insgesamt 18 Kreuzungen durchgeführt werden. Von diesen 18 Kreuzungen konnte bei insgesamt 12 Kreuzungen eine signifikante Abweichung der erwarteten Vererbung beobachtet werden. Sechs Linien zeigten nach der Auskreuzung ihres Pollens eine deutlich verringerte Weitergabe der transgenen Eigenschaften in die nächste Generation (< 10 %), während drei Linien auch bei der Bestäubung des Kolbens mit A188 Pollen eine Abweichung in der normalerweise erwarteten Vererbung zeigten. Die Kreuzungen der Pflanze pGermlineEx1-3402 HS2 #1 zeigte nach der Bestäubung des Kolbens mit A188 Pollen mit 47,2 % Wildtyp Nachkommen keine Abweichung von der erwarteten Vererbung. Die Bestäubung eines A188 Kolbens mit Pollen dieser Pflanze hingegen ergab bei den 17

Nachkommen keine Weitergabe der transgenen Eigenschaften. Die Pflanze pGermlineEx1-3440 HS3 #3 zeigte auch bei der Bestäubung des eigenen Kolbens mit Pollen der Linien A188 eine typische Vererbung der Eigenschaften, mit 23 *uidA* positiven und 18 *uidA* negativen Nachkommen. Nach der Auskreuzung des transgenen Pollens konnte aber nur bei 5 Nachkommen (9,3 %) das *uidA* Gen nachgewiesen werden, 49 Nachkommen waren *uidA* negativ (90,7 %). Die Kreuzungen mit der Pflanze pGermlineEx1-3725 HS3 #2 ergaben bei der Einkreuzung von A188 Pollen eine Normalverteilung bei der Vererbung (44,7 % transgene Nachkommen). Die Auskreuzung des transgenen Pollens mit 17 Nachkommen erzeugte aber keinen einzigen, bei dem das *uidA* Gen festgestellt werden konnte. Mit der Pflanze pGermlineEx1-3735 HS2 #1 konnte keine Einkreuzung simuliert werden, da diese Pflanze keinen Kolben ausbildete. Die Auskreuzung des Pollens erzeugte aber aus 89 Nachkommen nur eine Pflanze (1,1 %) mit transgenen Eigenschaften.

Konstrukt	Anzahl an Linien	Anzahl an vollständig aktivierten Linien	Anzahl der Linien (Gesamtzahl an Auskreuzungen)	Abweichung in der Segregation (> 90 %)	Auskreuzungen ohne transgenen Phänotyp
pPollenEx1	135	12/16 (75 %)	7 Linien (11x)	2 (1)	0
pPollenEx2	133	11/14 (79 %)	11 Linien (26x)	3 (1)	1
pGermlineEx1	70	7/12 (58 %)	7 Linien (18x)	7 (5)	5
pGermlineEx2	60	9/12 (75 %)	9 Linien (21x)	2 (1)	0

Mit der Pflanze pGermlineEx1-387 HS1 #1 konnte nach der Einkreuzung von A188 Pollen eine verringerte Weitergabe der transgenen Eigenschaften festgestellt werden. 64 Nachkommen von insgesamt 92 (69,6 %) zeigten keine positive GUS-Färbung. Diese Ergebnisse konnten aber in einem erneuten Experiment derselben Linie nicht bestätigt werden. Die Auskreuzungen der Pflanzen pGermlineEx1-387 HS3 #2 zeigten sowohl in der Auskreuzung von transgenem Pollen (60 % Wildtyp Nachkommen) als auch in der Einkreuzung von A188 Pollen (48,3 % Wildtyp Nachkommen) keine Auffälligkeiten in der Vererbung. Kreuzungen mit der Pflanze pGermlineEx1-3.3.8 HS1 #1 zeigten in den 30 Nachkommen einer Auskreuzung des Pollen keine transgenen Eigenschaften. Nach der Einkreuzung von A188 Pollen konnte aus den 38 Nachkommen bei einem (2,6 %) das *uidA*

Gen bestätigt werden. Bei den Nachkommen der Pflanze pGermlineEx1-3715 HS3 #2 konnten weder nach der Auskreuzung des Pollens (134 Nachkommen) noch nach der Bestäubung des Kolbens mit A188 Pollen (102 Nachkommen) die transgenen Eigenschaften in der Folgegeneration gezeigt werden. Dieses entspricht einer maximalen Fehlerrate von unter 0,42 %. Nach der Aktivierung durch Hitzeschock konnten mit Pflanzen von neun Linien des Konstrukts pGermlineEx2 insgesamt 21 Kreuzungen durchgeführt werden. Die Nachkommen von sieben Linien zeigten sowohl während der Auskreuzung über den Pollenweg als auch nach der Bestäubung der jeweiligen Kolben mit A188 Pollen keine besonderen Auffälligkeiten in der Vererbung der transgenen Eigenschaften. Bei Auskreuzungen von zwei Linien konnten aber deutliche Abweichungen der erwarteten Segregation beobachtet werden. Pollen der Pflanzen pGermlineEx2-482 HS3 #1 konnte nicht für Auskreuzungen verwendet werden. Die Bestäubung des Kolbens mit Pollen der Linie A188 führte zu 26 Nachkommen mit transgenem Phänotyp (32,1 %) aus 81 Nachkommen. Die Kreuzung der Pflanze pGermlineEx2-4711 HS2 #1 ergab in der Auskreuzung des Pollens nur sieben Nachkommen mit detektierbarem *uidA* (20,6 %) und darüber hinaus in der Einkreuzung von A188 Pollen nur zwei Nachkommen (2,2 %) mit transgenen Eigenschaften bei insgesamt 92 Nachkommen.

3.4.1 Zusammenfassung der Auskreuzungsversuche

Verteilung der *uidA* Vererbung
(GUS positive : GUS negative)

Konstrukt	Auskreuzen von transgenem Pollen			Wildtyp Pollen bestäubt transgene Pflanze		
	Linien Nummer	Erwartetes Verhältnis	Beobachtetes Verhältnis	Erwartetes Verhältnis	Beobachtetes Verhältnis	
pPollenEx1	# 139	1:2	1:40	-	-	
	# 244	1:2	54:81	-	-	
pPollenEx2	# 284	1:2	0:59	-	-	100 %
pGermlineEx1	# 3402	1:2	0:17	1:2	38:34	100%
	# 3440	1:2	5:54	1:2	23:18	
	# 3715	1:2	0:134	1:2	0:102	100%
	# 3725	1:2	0:18	1:2	85:105	100%
	# 3735	1:2	1:88	-	-	
	# 3.3.8	1:2	0:30	1:2	1:37	100%
pGermlineEx2	# 4711	1:2	7:27	1:2	2:90	
	# 482	-	-	1:2	26:55	

3.5 Molekulare Analysen der Rekombination in T₂-Pflanzen

Nachdem die ersten Hinweise für eine erfolgreiche Rekombination während der Gametenentwicklung in den unterschiedlichen Linien gefunden werden konnten, wurde in weiteren Versuchen die finale Rekombination auf molekularer Ebene bestätigt. Hierzu wurden aus signifikanten Auskreuzungen von jeweils zwölf Nachkommen ohne transgenen Phänotyp genomische DNA isoliert.

3.5.1 Nachweis der zweiten Rekombination mittels PCR

Mithilfe einer PCR sollte das im Genom verbleibende Vektorgrundgerüst nachgewiesen und sequenziert werden. Für diesen Nachweis wurden die Primer T1R und T1F genutzt. Bei einer erfolgreichen Amplifikation sollte ein Fragment von etwa 430 bp nachweisbar sein. Die Ansätze wurden dem Platinum[®] Taq System (Life Technologies[™] Corporation, Darmstadt, Deutschland) im 20 µl Maßstab vorbereitet, mit einem Einsatz von etwa 50 ng genomische DNA für jeden Ansatz, einer Primerbindetemperatur von 65°C, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, sowie 40 Reaktionszyklen, um ein ausreichendes Amplifikat zu erhalten. Nach der PCR wurden die Reaktionsgemische mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Amplifikation der Vektorreste nach der finalen Rekombination im Genom konnte in einigen Linien erfolgreich durchgeführt werden.

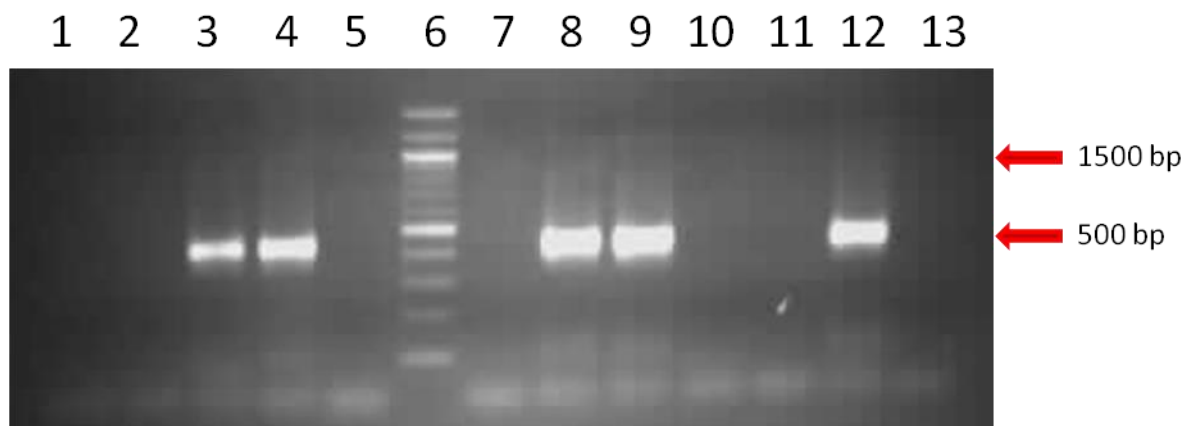


Abbildung 18: Nachweis der finalen Exzision in Nachkommen von pGermlineEx1-3735 HS2 #1

mit Hilfe der PCR

Nachdem die phänotypische Analyse der Nachkommen von pGermlineEx1-3735 HS2 #1 deutliche Abweichungen in der Segregation des transgenen Phänotyps zeigte (1,1 % transgener Phänotyp) wurden weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Exzision des Konstrukts zu verifizieren. Hierfür wurden von 12 Nachkommen ohne transgenen Phänotyp gDNA isoliert und mit Hilfe der Primer T1R und T1F sollte das verbleibende 504 bp Fragment im Genom der Nachkommen nachgewiesen werden. Die erwartete Größe des amplifizierten Fragments betrug etwa 430 bp. Nach der Amplifikation konnte bei 5 der 12 Nachkommen (Spur 3, 4, 8, 9 und 12) das erwartete Fragment nachgewiesen werden. Eine anschließende Sequenzierung des Amplifikats bestätigte die erfolgreiche und sequenzgenaue Exzision des Konstrukts aus dem Genom der Pflanzen. In Spur 6 befindet sich die 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)

In Abbildung 18 ist die PCR Analyse der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3735 HS2 #1 gezeigt. In den Spuren 1-5 sowie 7-13 sind die PCR Ansätze der jeweiligen Nachkommen 1-5 und 6-12 aufgetrennt, in Spur 6 ist der Marker zu sehen. Wie erwartet zeigten nur einige Nachkommen die erfolgreiche Rekombination, da statistisch die Hälfte der Nachkommen aufgrund der eingesetzten hemizygoten Linie durch Segregation ihre transgenen Eigenschaften verloren hatten. In den Nachkommen #3, 4, 7, 8 und 11 konnte mittels PCR die finale Rekombination nachgewiesen werden, wobei die sequenzgenaue Exzision des Konstrukts durch eine anschließende Sequenzierung des Amplifikats bestätigt wurde. In einem direkten PCR Nachweis wurde mit den Primern T1F und T1R die zweite Rekombination in den folgenden Nachkommen von Kreuzungen nachgewiesen. Die Kreuzung A188 x pPollenEx1-139 HS1 #3 zeigte in den Nachkommen T₂ #3 und #6 eine Exzision des Konstrukts während der Pollenbildung. In der Analyse der Kreuzung A188 x pPollenEx1-284 HS1 #4 zeigten die Nachkommen T₂ #4, #11, #12 die spezifische Exzisionsbande in der PCR. Die Kreuzung A188 x pPollenEx1-244 HS1 #6 zeigte in dem Nachkommen T₂ #8 die gewebespezifische Exzision des Konstrukts. Die Nachkommen T₂ #2, #5, #8 und #10 der Kreuzung A188 x pPollenEx2-288 HS1 #2 konnten positiv auf die Exzision des Konstrukts getestet werden. Eine Exzision des Konstrukts während der Pollenentwicklung konnte bei der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3735 HS2 #1 in den Pflanzen T₂ #3, #4, #7, #8 und #11 gezeigt werden. Darüber hinaus konnte bei der Einkreuzung von A188 Pollen in die Linie pGermlineEx1-3715 HS3 #2 bei der Pflanze T₂ #4 eine Exzision gezeigt werden.

Während die Amplifikation der zweiten Rekombination des Konstrukts für einige Linien erfolgreich durchgeführt werden konnte, zeigte sich bei den Kreuzungen einiger Linien (zum Beispiel pGermlineEx1-3440 oder pGermlineEx2-4711) trotz einer sehr starken Abweichung der normalen Segregationsverhältnisse keine mittels PCR nachweisbare Rekombination. So konnte in der Kreuzung A188 x pGermlineEx1 HS3 #3 aus 54 Nachkommen bei nur 5 Nachkommen ein transgener Phänotyp festgestellt werden. Eine anschließende PCR-Analyse von 12 Nachkommen ohne transgenen Phänotyp zeigte aber in keinem der Nachkommen die erwartete 430 bp Bande. Ähnliche Schwierigkeiten zeigten sich auch bei der PCR Analyse der Nachkommen der Pflanze pGermlineEx2-4711 HS2 #1. Sowohl die Auskreuzung des Pollens, als auch die Einkreuzung von A188 Pollen zeigte in den Nachkommen einen deutlich geringeren Anteil an transgenen Nachkommen (20,6 % über den Pollen, 2,2% aus dem

eigenen Kolben). Die PCR Analysen zeigen aber in keinem der untersuchten Nachkommen das erwartete 430 bp Fragment.

3.6 Nachweis der Rekombination am Integrationsort in der genomischen DNA

Der Nachweis der Rekombination mittels PCR stellt für die ersten Überprüfungen ein probates Mittel dar. Aufgrund des Einsatzes der Konstrukte in der Sicherheitsforschung der Biotechnologie musste zusätzlich der Beweis erbracht werden, dass die Integrationsorte während der Rekombination keinen Veränderungen unterliegen. Darüber hinaus würde eine detaillierte Analyse und Nachweis der Integration im pflanzlichen Genom die Erfassung falsch positiver Exzisionen aufgrund von Plasmidkontamination ausschließen.

3.6.1 Ermittlung des Integrationsortes der T-DNA im Genom mittels inverser PCR

Das Prinzip der inversen PCR ermöglicht die Amplifikation eines unbekanntes Fragments in zirkulärer DNA (Ochman et al. 1988). Diese Methode wird insbesondere dann eingesetzt, wenn ein bereits bekannter Bereich, ein Transposon oder ein Konstrukt, in einem unbekanntes Bereich, wie zum Beispiel genomischer DNA, integriert ist. Innerhalb des bekannten DNA Bereichs werden Primer abgeleitet, die nicht, wie bei einer normalen PCR aufeinander zugerichtet sind, sondern in ihrer Elongationsrichtung voneinander weg weisen. Die DNA wird nun mit einem Restriktionsenzym gespalten, welches außerhalb der Primerbindestellen die DNA fragmentiert. Nach der Restriktion der DNA werden die Fragmente durch eine Ligationsreaktion zirkularisiert. Dieses hat zur Folge, dass die Primer nun auf dem ringförmigen Fragment einander gegenüberstehen und eine Amplifikation des dazwischen liegenden, unbekanntes Bereiches möglich ist. Um eine größere Auswahl an Restriktionsenzymen einsetzen zu können, wurden die Primer für die inverse PCR im Right Border Bereich der Konstrukte angesetzt. Da das Auftreten einer Restriktionsstelle im Genom zufällig ist, wurden in unterschiedlichen Ansätzen vier verschiedene Restriktionsenzyme für die Fragmentierung der DNA eingesetzt. Darüber hinaus wurden

weitere Primer abgeleitet, die für eine Reamplifikation zur Verfügung stehen sollten. Dadurch sollten nach der inversen PCR die erhaltenen Amplifikate verifizieren und eventuelle Fehlbindungen der Primer aufgedeckt werden. Für die Amplifikation aus dem Right Border Bereich heraus in das Genom wurden für sämtliche Konstrukte nur zwei Primer erstellt (Integrationsort A und Integrationsort B). Die Bindestellen dieser Primer lag im Bereich des Grundvektors und war bei allen Konstrukten gleich. Die komplementären Primer hingegen, mussten auf das zweite Rekombinasegen im Konstrukt abgestimmt werden. Dieses war bei Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 die FLP Rekombinase und die Primer Anti-5'-5.8A und Anti-5'-5.8B. Für Linien mit dem Konstrukt pPollenEx2, pGermlineEx1 oder pGermlineEx2 war die Cre Rekombinase für die finale Exzision vorgesehen, deshalb wurden für diese Linien die Primer Anti-5'-6.8A und Anti-5'-6.8B erstellt. In den ersten Versuchen konnte zwar schon einzelne Erfolge erzielt werden, aber der Anteil an Fehlbindungen im Genom war mit den ursprünglichen Primern zu hoch. Daher wurden erneut Oligonukleotide erstellt (iPCR6.8, iPCR5.8 sowie IntOrtFLP, IntOrtCre und T1Ri), welche dann für neue Ansätze und zur Verifikation der Ergebnisse eingesetzt wurden. Diese besaßen eine Länge von mindestens 30 bp und wurden vor dem Einsatz in einer PCR auf Fehlbindungen im Maisgenom hin untersucht. Für die Restriktion der Linien konnten generell die Enzyme BamHI, EcoRI und SpeI eingesetzt werden. Darüber hinaus wurde NcoI bei Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 eingesetzt, bei Linien mit dem Konstrukt pPollenEx2, pGermlineEx1 oder pGermlineEx2 das Enzym XbaI. Die Restriktionen wurden in einem 20 µl Maßstab mit 5 µg genomischer DNA und 10 U Restriktionsenzym für mindestens 12 Stunden durchgeführt und danach durch eine Inkubation für 20 min bei 80°C inaktiviert. Nach der Restriktion der genomischen DNA wurde die Ligation zur Bildung zirkulärer DNA in einem Volumen von 200 µl angesetzt. Ziel der Ligation war die Vereinigung von nur einem DNA Fragment und nicht das wahllose Zusammenfügen von Restriktionsfragmenten. Daher wurde die DNA Konzentration von 250 ng/µl auf 25 ng/µl herabgesetzt. Die Ligationen wurden bei 21°C mit 10 U T4 Ligase für zwei Stunden durchgeführt und danach für 20 min bei 80°C erneut inaktiviert.

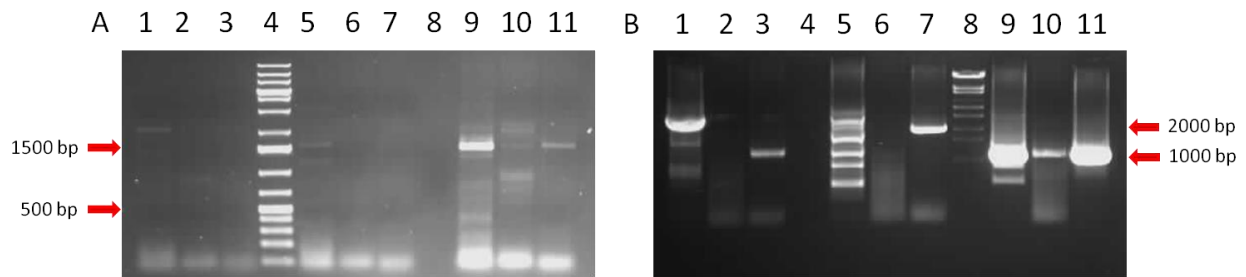


Abbildung 19: Integrationsortbestimmung der Linie pGermlineEx1-3715 durch inverse PCR

Für die Bestimmung des Integrationsortes wurden inverse PCR Ansätze (nach Ochmann et al. 1988) durchgeführt. Die eingesetzten Primer binden in dem Konstrukt, zeigen aber in ihrer Elongationsrichtung voneinander weg. Nach der Restriktion der gDNA werden die einzelnen Fragmente durch eine Ligation zu ringförmigen Molekülen verknüpft, so dass die Primer die Amplifikation des außerhalb des Konstrukts liegenden Bereichs ermöglichen. Aufgrund der unbekanntesten Schnittstellenverteilung im umgebenden Genom des Integrationsortes wurden unterschiedliche Restriktionsenzyme eingesetzt. Es wurden jeweils 5 µg gDNA der Linie pGermlineEx1-3715 mit NcoI (Spur 1-3), EcoRI (Spur 5-6) und BamHI (Spur 9-11) in einem 20 µl Ansatz fragmentiert und anschließend durch eine Ligation in einem 200 µl Ansatz zirkularisiert. Für die erste Amplifikation (Bild A) wurden drei verschiedenen Primerkombinationen A (iPCR6.8 und IntOrtCre, Spur 1, 5 und 9), B (iPCR6.8 und T1Ri, Spur 2, 6 und 10) und C (Anti-5'-6.8B und IntOrtCre, Spur 3, 7 und 11) in einem 20 µl PCR Ansatz mit jeweils 100 ng religierter gDNA eingesetzt. In Spur 4 befindet sich der GeneRuler™ 1kb Plus Marker (Thermo Fisher Scientific Inc., St.Leon-Rot, Deutschland). Erkennbare Banden (Spur 1 ~ 2,0 kbp, Spur 5 ~ 1,3 und 1,6 kbp sowie Spur 9 und 11 jeweils ~1,5 kbp) wurden aus dem Gel isoliert und für eine Sequenzierung subkloniert. Jeweils 1 µl der ersten inversen PCR wurden in einer 1:20 Verdünnung mit der Primerkombination B (iPCR6.8 und T1Ri) erneut in einer PCR eingesetzt. Diese innen liegende Primerkombination sollte vorhandene Banden verifizieren (siehe Spur 1, 9 und 11 in Bild A und B), bislang zu schwache Amplifikate verstärken (Siehe Spur 3,7 und 10 in Bild A und B) und falsche Primerbindungen aufdecken (siehe Spur 5 und 10 in Bild A und B). In Spur 8 wurde die 1kb DNA Ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) benutzt. Verifizierte Banden und neue deutliche Banden wurden aus dem Gel isoliert und sequenziert.

Für die anschließende Amplifikation der Fragmente wurde das Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) benutzt. Da die zu erwartende Größe der Amplifikate nicht genau bekannt war, wurde das >12kb System 3 genutzt, wobei die einzelnen Ansätze mit 100 ng Religation im 20 µl Maßstab durchgeführt wurden. Die PCR Bedingungen wurden in Anlehnung an das vorgegebene Protokoll wie folgt beschrieben gewählt. Eine initiale Denaturierung bei 94°C für zwei Minuten, gefolgt von zehn Zyklen, bestehend aus 10 sec bei 94°C, 30 sec bei 58°C und einer Elongation bei 68°C für fünf Minuten. Nach dieser ersten Phase der Amplifikation wurden weitere 25 Zyklen durchgeführt, mit 15 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec bei 58°C gefolgt von einer fünfminütigen Elongation, die mit jedem weiteren Zyklus um 20 sec verlängert wurde, so dass die letzte Elongation 13 min 20 sec dauerte. Danach folgte eine finale Elongation für 7 min. Je 1 µl der Ansätze der inversen PCR wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt und 1 µl wurde für

eine erneute PCR mit dem zweiten Primerpaar in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese der verschiedenen Ansätze wurden die einzelnen sichtbaren Banden ausgewertet. Dabei wurde zum Beispiel die minimale Größe des Fragmentes, vorgegeben durch den Anteil des Vektors in der PCR, sowie die Veränderung der Fragmentgröße von inverser PCR zu der nachfolgenden PCR abgeglichen. In Abb.19 A ist das Ergebnis der inversen PCR für verschiedene Religationen der Linie pGermlineEx1-3715 mit jeweils drei verschiedenen Primerkombinationen (A: iPCR6.8 und IntOrtCre; B: iPCR6.8 und T1Ri und C: Anti-5'-6.8B und IntOrtCre) zu sehen. In Abb.19A in Spur 1-3 befinden sich die inversen PCR Ansätze A, B und C einer Religation der Linie pGermlineEx1-3715, welche zuvor mit NcoI geschnitten wurde. In Spur 5-7 die inversen PCR Ansätze A, B und C der Religation der EcoRI Restriktion. Daneben in Spur 9-11 vergleichbare Ansätze der BamHI Restriktion. Eine zweite Amplifikation mit einer 1:20 Verdünnung der inversen PCR Ansätze mit der Primerkombination B ist parallel in Abb.19 B zu sehen. Die entstehenden Banden wurden aus dem Gel isoliert und für die anschließende Sequenzierung in den Vektor pJet1.2 kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Vektoren abgeglichen und die Informationen der genomischen DNA wurden über die Maize Genome Database (www.maizegdb.org) verglichen. Die Informationen der inversen PCR betrafen nur die Right Border Sequenz des Integrationsortes. Für die ermittelten Integrationsbereiche der Konstrukte wurde dann anhand der vorhandenen Sequenzen der Datenbank neue genombasierende Primer erstellt. Mit Hilfe dieser Primer sollte zum einen der Right Border Bereich als auch der dazugehörige Left Border Bereich der Linien bestätigt werden. Es konnten in den verschiedenen Ansätzen der Integrationsort von vier verschiedenen Linien ermittelt werden. Der Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3440 befindet sich auf dem Chromosom 4 und konnte auch in der T₂ Generation nach der Exzision des Konstrukts als stabil nachgewiesen werden. Für die Linie pGermlineEx1-3735 konnten Integrationsorte auf dem Chromosom 3 und 4 gezeigt werden. Die stabile Integration auf Chromosom 4 konnte auch nach der Exzision gezeigt werden. Die Linie pGermlineEx1-3715 liegt auf Chromosom 4, es konnten aber keine Nachweise für den Verbleib nach der Exzision durchgeführt werden. Der Integrationsort der Linie pGermlineEx2-4711 lag auf Chromosom 1 und war auch nach der Exzision stabil.

3.6.2 Validierung des Integrationsortes und dessen Stabilität während der Rekombination

3.6.2.1 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440

Für die Linie pGermline-3440 konnte die Integration des Konstrukts auf dem Chromosom 4 zwischen Position 159664516 und 159664710 nachgewiesen werden. An der linken Flanke des Konstrukts (Abb.20A) befindet sich zwischen genomischer DNA und Konstrukt ein 35 bp großer Bereich mit so genannter filler DNA (violette Box), die in die verbleibenden 15 bp der Left Border Sequenz (türkisfarbene Box) übergeht. Auf der rechten Seite (Abb.20B) verbleiben nur 2 bp der Right Border Sequenz (türkisfarbene Box) gefolgt von einem inversen Fragment der 35S Terminatorsequenz (violetter Pfeil). Daran angeschlossen konnte eine Duplikation des Left Border Bereichs (LB Duplikation, violetter Pfeil) nachgewiesen werden. Diese etwa 600 bp große Duplikation beinhaltet Teile der Left Border Sequenz (LB Rest, violette Box) und das gesamte linke Vektorgrundgerüst mit einer weiteren *loxP* Sequenz (*loxP*2, violetter Pfeil) und geht während der Duplikation eines Teils des 35S Terminators in eine filler DNA Sequenz (filler DNA, violette Box) über, an der sich die genomische DNA (Chr4, grüner Pfeil) anschließt. Nachdem die Integration für die T_1 Generation nachgewiesen werden konnte, wurde die Stabilität des Integrationsortes nach der Exzision des Konstrukts überprüft. Hierbei konnte die stabile Integration auf dem Chromosom 4 gezeigt werden, aufgrund der Duplikation des Left Border Bereichs während der Integration und der daraus resultierenden dritten *loxP* Sequenz sind während der Exzision mehrere Produkte möglich (Abb.21 A und B).

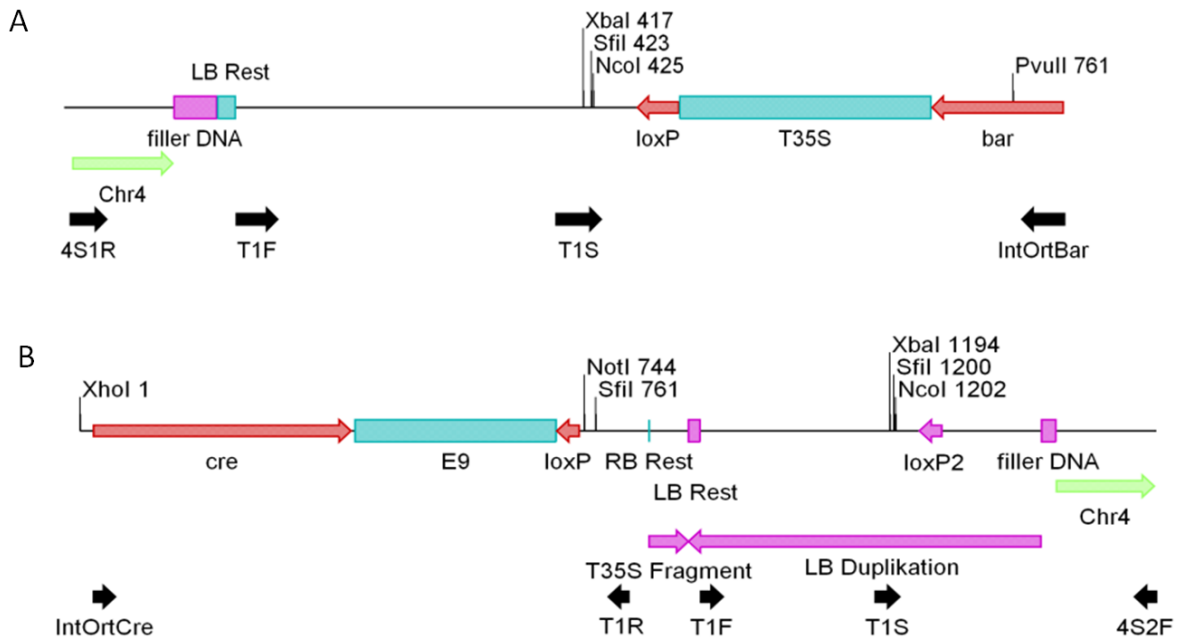


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440

Analysen der erhaltenen Sequenzen der inversen PCR und ein Abgleich mit den Sequenzen des Genoms der Linie B73 (www.maizegdb.org) zeigten eine hohe Homologie zu einem Sequenzabschnitt auf dem Chromosom 4. Um den Integrationsort zu verifizieren wurden, ausgehend vom B73 Genom, Primer abgeleitet, mit denen ein direkter PCR Nachweis des Integrationsortes möglich war. Die direkte Amplifikation der linken Konstruktsseite mit Hilfe der Primerkombination 4S1R und IntOrtBar, sowie der rechten Konstruktsseite mit der Primerkombination IntOrtCre und 4S1F bestätigte die Integration des Konstrukts im Chromosom 4 zwischen Position 159664516 und 159664710. Auf der linken Seite (A) der Integration wurden zwischen genomischer DNA (hellgrüner Pfeil) und dem Konstrukt die Integration von 35 bp sogenannter filler DNA (violette Box) festgestellt. Von der Left Border Sequenz (türkisfarbene Box) bestehen noch 15 bp. Die Veränderungen im Right Border Bereich umfassen nach 2 bp verbleibender Right Border Sequenz ein invertiertes Fragment des T35S (violetter Pfeil) an das sich ein 600 bp Duplikation der linken Konstruktsseite anschließt (LB Duplikation, violetter Pfeil). Diese Duplikation beinhaltet 17 bp der Left Border Sequenz, eine weitere *loxP* Sequenz (*loxP2*, violetter Pfeil) und geht im Bereich des 35S Terminators in einen 21 bp großen Bereich mit filler DNA über, der die Integration zum Chromosom 4 (Chr4, grüner Pfeil) abschließt. Primerbindestellen sind als schwarze Pfeile, die genomische DNA als grüner Pfeil und Gene sowie die Rekombinaseerkennungssequenzen als rote Pfeile mit ihrer entsprechenden Orientierung dargestellt. Aberrationen des Integrationsortes sind in Violett dargestellt, im Falle von Konstruktbestandteilen in der jeweiligen Orientierung.

Falls die innenliegende, erste *loxP* Sequenz für die Exzision genutzt werden würde, verbliebe das Left Border Duplikat im Genom (Abb.21A). Bei einer Exzision mit der zweiten *loxP* Sequenz oder bei einer zweiten Rekombination zwischen den zwei verbleibenden *loxP* Sequenzen würden die Right Border Sequenzen aus dem Integrat entfernt und nur noch ein Teil der Left Border Duplikation im Genom verbleiben (Abb.21B). PCR Analysen sollten die genaue Struktur des Integrationsortes nach der Exzision aufklären.

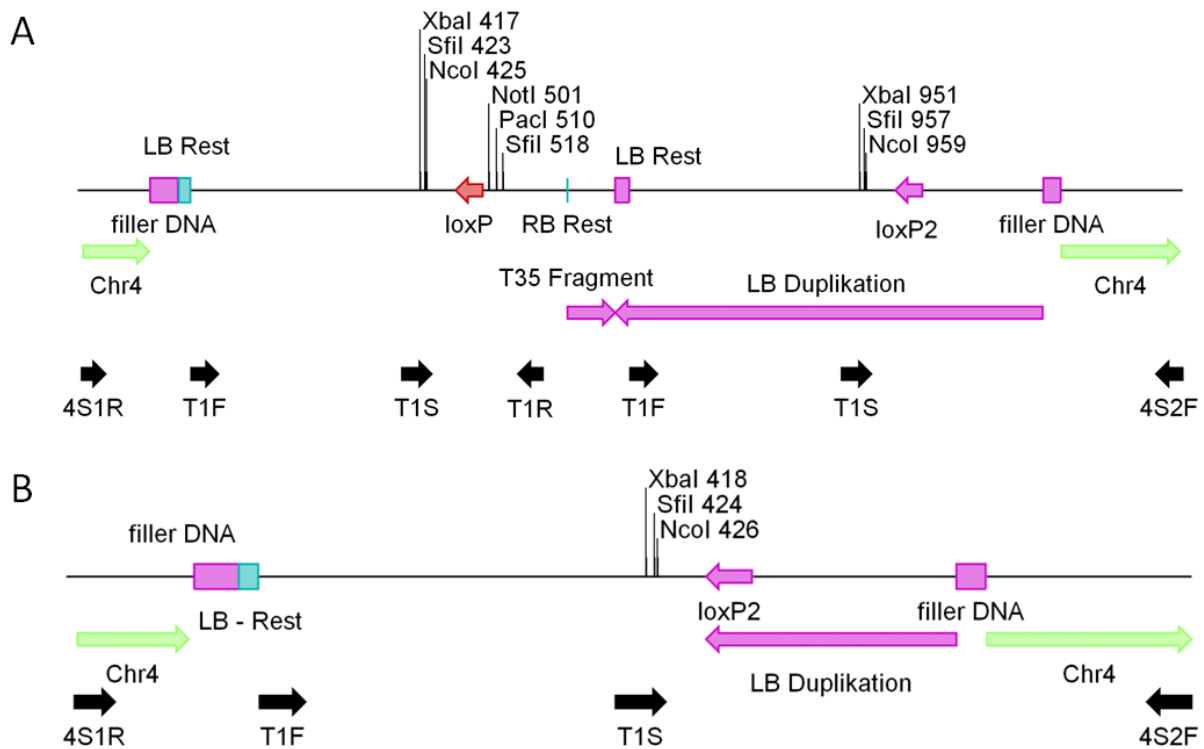


Abbildung 21: Schema der möglichen Exzisionsvarianten von Nachkommen der Linie pGermlineEx1-3440 HS3 #3

Die Duplikation von Bestandteilen der linken Seite des Konstrukts auf der rechten Seite führte zu insgesamt drei *loxP* Sequenzen (Abb.20A und B) im Konstrukt nach der Integration. Bei der finalen Rekombination durch die Cre Rekombinase wären theoretisch zwei Varianten der Exzision möglich. Eine Rekombination zwischen der *loxP* Sequenz von der linken Seite des Konstrukts (Abb.20A) mit der ersten *loxP* Sequenz der rechten Seite (Abb.20B), wie eigentlich vorgesehen, würde zu einem verbleibenden Integrat von 1,1 kbp führen und ist in Bild A schematisch dargestellt. Nach der Rekombination zwischen der linken *loxP* Sequenz (Abb.20A) und der zweiten *loxP* Sequenz der rechten Seite (Abb.20B, *loxP2*), die aus der Duplikation des Left Border Bereiches stammt, verbliebe ein Rest von etwa 540 bp nach der Exzision im Genom. Eine weitere Möglichkeit wäre eine zweite Rekombination zwischen den beiden verbleibenden *loxP* Sequenzen (Bild A), die zu der Exzision der Right Border Bereiche führen würde und zu dem gleichen verbleibenden Integrat führen würde, wie eine Rekombination der beiden außen liegenden *loxP* Sequenzen. Primerbindestellen sind als schwarze Pfeile, die genomische DNA als grüner Pfeil und Gene sowie die Rekombinaseerkennungssequenzen als rote Pfeile mit ihrer entsprechenden Orientierung dargestellt. Aberrationen des Integrationsortes sind in Violett dargestellt, im Falle von Konstruktbestandteilen in der jeweiligen Orientierung.

Die Stabilität des Integrationsortes konnte auf der linken Seite des Konstrukts mittels PCR mit der Primerkombination T1Fi und 4S1R gezeigt werden. Die Überprüfung der rechten Seite des Konstrukts wurde durch die Duplikation des Left Border Bereiches erschwert. Der Primer T1F, der auf der linken Seite des Konstrukts nach innen zeigt, konnte hier auf der rechten Seite für einen PCR Nachweis der Exzision mit dem genomspezifischen Primer 4S2F genutzt werden. Bei einer Exzision, die die beiden äußeren, aus den Left Border Sequenzen stammenden Rekombinationssequenzen beinhaltet, würde als ein etwa 600 bp großes Fragment nachweisbar sein. Darüber hinaus wurde in parallelen Ansätzen der Primer T1Ri

zusammen mit dem genomspezifischen Primer 4S2F eingesetzt. Falls die innere der beiden *loxP* Rekombinationssequenzen für die Exzision genutzt worden wäre, könnte dies in einem etwa 750 bp großen Amplifikat nachgewiesen werden.

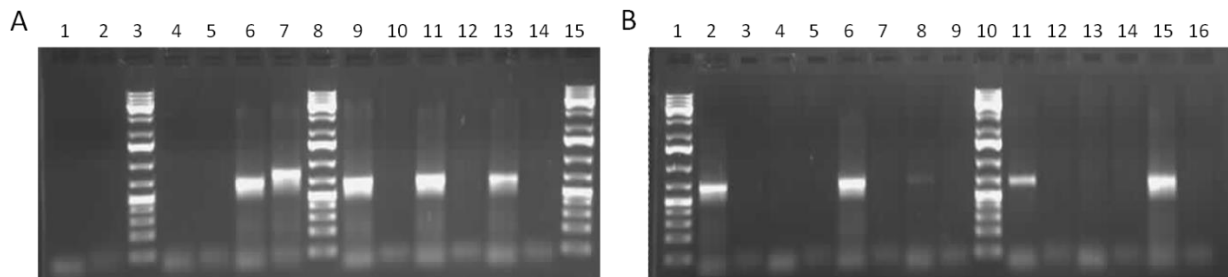


Abbildung 22: Überprüfung des Konstrukts im Integrationsort nach der Exzision

Aufgrund der insgesamt drei *loxP* Sequenzen in der Linie pGermlineEx1-3440 durch die Duplikation von 600 bp der linken Seite des Konstrukts an die Right Border Sequenz (Abb.20B) wurde überprüft, welche der zwei zur Verfügung stehenden *loxP* Sequenzen für die Exzision eingesetzt wurde (Abb.21 A und B). Hierfür wurde aus Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3440 HS3 #3, die keinen transgenen Phänotyp zeigten gDNA isoliert. Mit den Primerkombinationen T1F und 4S2F sowie T1Ri und 4S2F wurde versucht, die rechte Seite des Konstrukts nach der Exzision zu amplifizieren. Bei Pflanzen mit erfolgreicher Exzision sollte die Primerkombination T1F und 4S2F ein etwa 600 bp großes Amplifikat erzeugen unabhängig von der genutzten *loxP* Sequenz. Falls die erste *loxP* Sequenz für die Exzision genutzt wird, sollte die Primerkombination T1Ri und 4S2F zu einer etwa 750 bp großen Bande führen (Abb.21A). Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne Template (Bild A Spur 1 und 2) und A188 gDNA (Bild A Spur 4 und 5) durchgeführt. Die Kontrolle der PCR wurde mit Hilfe von gDNA der Pflanze pGermlineEx1-3440 HS3 #3 durchgeführt und zeigt sowohl das 600 bp Amplifikat der Kombination T1F und 4S2F (Bild A Spur 6) als auch die 750 bp Bande der Kombination T1Ri und 4S2F (Bild A Spur 7). In der Analyse der Nachkommen (Bild A Spur 9-14 und Bild B Spur 2-16) konnte bei einigen die Exzision des Konstrukts mit Hilfe der Primerkombination T1F und 4S2F gezeigt werden (Bild A Spur 9, 11 und 13 sowie Bild B Spur 2, 6, 8, 11 und 15), die Nachkommen #5 (Bild B Spur 4 und 5) und #9 (Bild B Spur 13 und 14) zeigen keine residualen Konstruktbestandteile. Eine Amplifikation mit der Primerkombination T1Ri und 4S2F war in den Nachkommen nicht möglich, was bedeutet, dass in diesen Fällen die zweite *loxP* Sequenz für die Exzision verwendet wurde oder dass eine zweite Exzision stattgefunden hat (Abb.21B). Der GeneRuler™ 1kb Plus Marker (Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, Deutschland) wurde für die Größenbestimmung eingesetzt (Bild A Spur 3, 8 und 15 sowie Bild B Spur 1 und 10).

Für jeden Nachkommen der Kreuzung kämen unabhängig beide Möglichkeiten in Frage. In der Abb.22A ist die Auswertung der parallelen PCR Versuche gezeigt. In der Spur 1 und 2 sind die Wasserkontrollen der Primerkombinationen T1F und 4S2F (Spur 1) sowie T1Ri und 4S2F (Spur 2). Nach dem Marker sind Kontrollen mit denselben Primerkombinationen gezeigt. Zum einen als weitere negative Kontrolle mit genomischer DNA der Linie A188 (Abb.22A: Spur 4 und 5) und zum anderen eine positive Kontrolle mit genomischer DNA der Pflanze pGermlineEx1-3440 HS3 #3 (Abb.22A: Spur 6 und 7, Abb.20B), von der die zu untersuchenden Nachkommen abstammen. In den Analysen der Mutterpflanze konnte sowohl das etwa 600 bp Amplifikat der Primerkombination T1F und 4S2F (Spur 6), als auch das etwa 750 bp Amplifikat der Primerkombination T1Ri und 4S2F (Spur 7) nachgewiesen

werden. In den Spuren 9-14 sind PCR Analysen von drei Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3440 HS3 #3 in denen das *uidA* Gen nicht mehr nachgewiesen werden konnte, jeweils erst mit dem Test der Primerkombination T1F und 4S2F und danach T1Ri und 4S2F. Alle drei Nachkommen zeigen die erfolgreiche Exzision des Konstrukts und darüber hinaus, aufgrund der fehlenden Banden mit der zweiten Primerkombination (Abb.22A: Spur 10, 12 und 14), dass die beiden äußeren *loxP* Sequenzen für die Exzision genutzt wurden. Die Abbildung 22B zeigt die Analysen von weiteren Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3440 HS3 #3. Auch hier konnte für einige Nachkommen die erfolgreiche Exzision gezeigt werden (Nachkomme #4 in Spur 2, #6 in Spur 6, #7 in Spur 8, #8 in Spur 11 und #10 in Spur 15). Eine Exzision mit der inneren *loxP* Sequenz konnte in keinem der Fälle nachgewiesen werden (Abb.22B: Spur 3, 7, 9, 12 und 16).

3.6.2.2 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711

Für die Linie pGermlineEx2 konnte nach der inversen PCR die Integration des Konstrukts auf Chromosom 1 zwischen Position 3178349 und 3178370 nachgewiesen werden. Die Integrationsstelle in dieser Linie zeigte, außer dem Verlust von Teilen (47 bp) des Left Border Bereichs, keine weiteren Auffälligkeiten bei der Insertion in das Genom. In der chromosomalen DNA konnte eine Abweichung in der Sequenz von dem Referenzgenom festgestellt werden, eine Integration von 186 bp, die in hoher Homologie (>95 %) etwa 253 mal verteilt über das gesamte Genom zu finden war. Die Stabilität der Integration während der Exzision in Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx2-4711 HS2 #1 konnte durch PCR Ansätze mit den Primer Kombinationen T1S und 4711 IP D sowie T1R und 4711 IP A bewiesen werden.

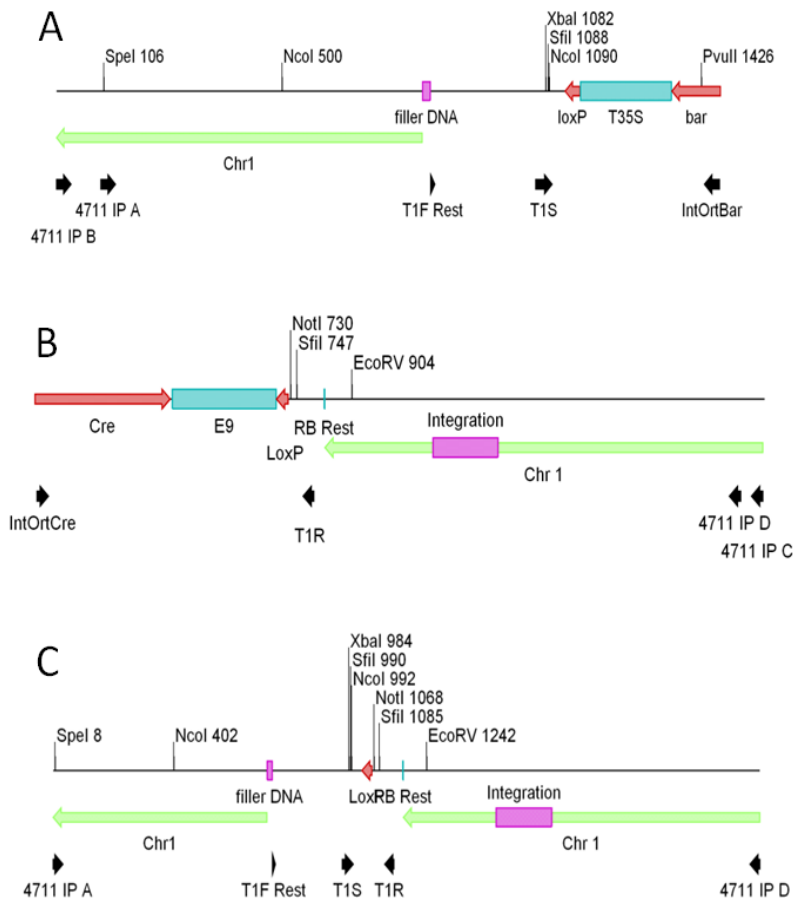


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711

Nach dem Abgleich der, mittels inverser PCR erhaltenen Sequenzen, mit der Genom der Maislinie B73 (www.maizegdb.org) lagen diese wahrscheinlich auf Chromosom 1. Nach der Ableitung verschiedener Primer (4711 IP A, B, C und D) konnte durch eine direkte Amplifikation die Integration des Konstrukts auf Chromosom 1 zwischen Position 3178349 und 3178370 bestätigt werden. Die Amplifikation mit Hilfe der Primer 4711 IP B und IntOrtBar der linken Seite des Konstrukts (Bild A) zeigte eine Integration von 18 bp filler DNA (Bild A, violette Box) sowie den Verlust von 47 bp des Konstrukts, darunter die vollständige Left Border Sequenz. Die Amplifikation des Right Border Bereichs (Bild B) mit Hilfe der Primer IntOrtCre und 4711 IP C zeigte nach einem 2 bp Rest der

Right Border Sequenz die Integration in das Chromosom 1. In der weiteren Sequenz des Chromosom konnte eine Abweichung vom dem Referenzgenom B73 festgestellt werden, eine 187 bp Integration (violette Box), die in hoher Homologie insgesamt über 200 mal im Genom auftrat. Durch PCR Ansätze mit den Primerkombinationen T1S und 4711 IP D sowie T1R und 4711 IP A konnte die sequenzgenaue Exzision des Konstrukts in dem Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx2-4711 HS2 #1 gezeigt werden (Bild C). Primerbindestellen sind als schwarze Pfeile, die genomische DNA als grüner Pfeil und Gene sowie die Rekombinaseerkenntnissequenzen als rote Pfeile mit ihrer entsprechenden Orientierung dargestellt. Aberrationen des Integrationsortes sind in Violett dargestellt, im Falle von Konstruktbestandteilen in der jeweiligen Orientierung.

3.6.2.3 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3715

Für die Linie pGermlineEx1-3715 konnte nur das Ergebnis der inversen PCR und die daraus resultierende rechte Seite des Integrationsortes bestätigt werden. Bei dieser Integration verblieben noch 2 bp der Right Border Sequenz, gefolgt von einer 100 bp großen Duplikation eines Teils des pActin Promotor aus dem Konstrukt, die als filler DNA genutzt wurde. Eine Amplifikation mittels abgeleiteter Primer für die linke Seite des Konstrukts blieb ohne Erfolg. Aufgrund des positiven Nachweises der erfolgreichen Exzision innerhalb des Konstrukts in

den Nachkommen der Kreuzung pGermlineEx1-3715 HS3 #2 x A188 T₂#4 und #8 muss von einem Fehler bei der Primerbindung im Genom ausgegangen werden.

3.6.2.4 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3735

Für die Linie pGermlineEx1-3735, die eigentlich als Einzelintegration in den Versuchen geführt worden ist, konnten bei der Auswertung der inversen PCR zwei Integrationsorte ermittelt werden. Eine Integration konnte auf Chromosom 4 zwischen Position 232152573 und 232152574 nachgewiesen werden. Die Integration der linken Konstruktseite konnte in separaten PCR Analysen mit Hilfe der Primer 3735 IP 4D und IntOrtBar bestätigt werden (Abb.24A). Die genomische DNA geht nach einem 28 bp großen filler DNA Fragment, gefolgt von 22 bp Left Border Sequenz, in das Konstrukt über. Die Integration des Konstrukts auf der rechten Seite konnte nur über zwei unabhängige inverse PCR Ansätze gezeigt werden. Hierbei wurde die genomische DNA mit BamHI oder NcoI behandelt. Die Ligation der beiden Restriktionen und die anschließende Amplifikation der ringförmigen Fragmente durch die Primerkombination IntOrtCre und iPCR 6.8 ergab in beiden Fällen deutliche Veränderungen in dem Konstrukttaufbau der rechten Seite (Abb.24B, Ergebnis der inversen PCR aus einer NcoI Restriktion). Auf die *loxP* Sequenz folgt ein 40 bp großes Integrat, von dem 25 bp der 35S Terminator Sequenz zugeordnet werden, die Herkunft der restlichen 15 bp konnte nicht einwandfrei geklärt werden. Während die Right Border Sequenz nicht mehr nachweisbar war, befinden sich die Sequenzen, die eigentlich zwischen der *loxP* Sequenz und der Right Border Sequenz lagen, in inverser Orientierung neben den Integrationssequenzen des 35S Terminator Fragments, dann folgte die chromosomale DNA.

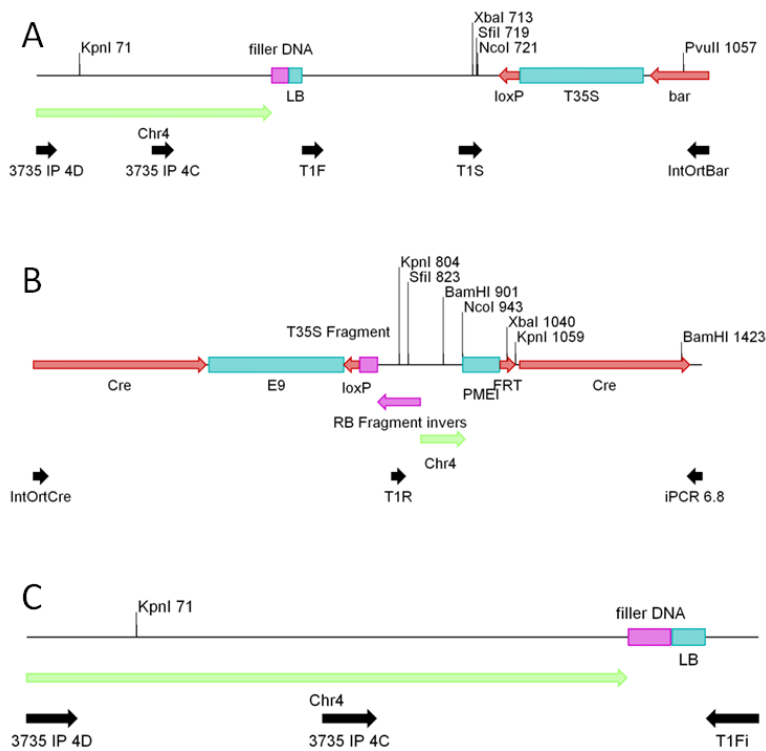


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3735

Analysen der Sequenzen der inversen PCR zeigten im Vergleich mit dem Genom der Linie B73 (www.maizegdb.org) einen der Integrationsorte auf dem Chromosom 4. Mit Hilfe der abgeleiteten Primer 3735 IP 4D und 3735 IP 4C in Kombination mit dem Primer T1Fi war es möglich, die Integration des Left Border Bereiches auf dem Chromosom 4 an Position 232152573 zu bestätigen. Versuche, den Right Border Bereich der durch die inverse PCR bei Position 232152574 postuliert wurde zu verifizieren, waren nicht erfolgreich. Die Integration an der linken Seite des Konstrukts (Bild A) zeigt ein 28 bp großes Fragment filler DNA (Bild A, violette Box), bevor 22 bp der Left

Border Sequenz (Bild A, türkisfarbene Box) den Übergang in den Konstruktbereich markieren. Im Right Border Bereich konnten bei den Analysen von zwei unabhängigen inversen PCR Ansätzen (BamHI Restriktion (nicht gezeigt) und NcoI Restriktion (Bild B) der gDNA) sowohl bei deutliche Veränderungen am Konstrukt gezeigt werden. Hinter der *loxP* Sequenz (Bild B, roter Pfeil) befanden sich eine 40 bp Integration (Bild B, T35S Fragment, violette Box), von der 25 bp dem 35S Terminator zugeordnet werden konnten. Daran schloss sich in inverser Orientierung die restlichen Sequenzen des Right Border Bereich des Konstrukts an, beginnend hinter der *loxP* Sequenz aber ohne die Right Border Sequenzen, die nahtlos in die genomische DNA des Chromosom 4 übergehen. Analysen der Nachkommen der Kreuzung A188 x pGermlineEx1-3735 HS2 #1 mit der Primerkombination T1Fi und 3735 IP 4D konnten in den Nachkommen T₂ #4 und #10 die Stabilität des Integrationsortes zumindest auf der linken Seite des Konstrukts bestätigen (Bild C). Primerbindestellen sind als schwarze Pfeile, die genomische DNA als grüner Pfeil und Gene sowie die Rekombinaseerkennungsequenzen als rote Pfeile mit ihrer entsprechenden Orientierung dargestellt. Aberrationen des Integrationsortes sind in Violett dargestellt, im Falle von Konstruktbestandteilen in der jeweiligen Orientierung.

Eine direkte Analyse der Integration auf der rechten Seite des Konstrukts war nicht möglich. Die Stabilität des Integrationsortes und die erfolgreiche finale Exzision konnte für die Integration in das Chromosom 4 für die Pflanzen A188 x pGermlineEx1-3735 HS2 #1 T₂ #4 und #10 nachgewiesen werden. Die zweite Integration erfolgte vermutlich auf dem Chromosom 3, vor Position 184164283. Für diese Integration konnte aber nur die rechte Seite des Konstrukts im Genom nachgewiesen werden (Abb.25). Die Integration in die genomische DNA geschah anscheinend ohne größere Veränderungen im Konstrukt oder der genomischen DNA. Von der Right Border Sequenz waren noch 5 bp nachweisbar, wobei aber während der Integration eine Sequenz von vier Cytosin-Nukleotiden zwischen die erste und zweite Position der Right Border Sequenz integriert wurde. Versuche den linken Teil im

Genom nachzuweisen scheiterten. Detaillierte Analysen für die finale Exzision auf Chromosom 3 konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden. Der direkte Nachweis der Exzision auf dem Konstrukt (Abb.18) konnte aber erfolgreich geführt werden. Da die Integration auf Chromosom 4 eine Inversion der rechten Randbereiche des Konstrukts aufweist (Abb.24B) und die verwendeten Primer dort keine Amplifikation zulassen, müssen die nachgewiesenen Exzisionsereignisse von der Integration auf dem Chromosom 3 stammen.

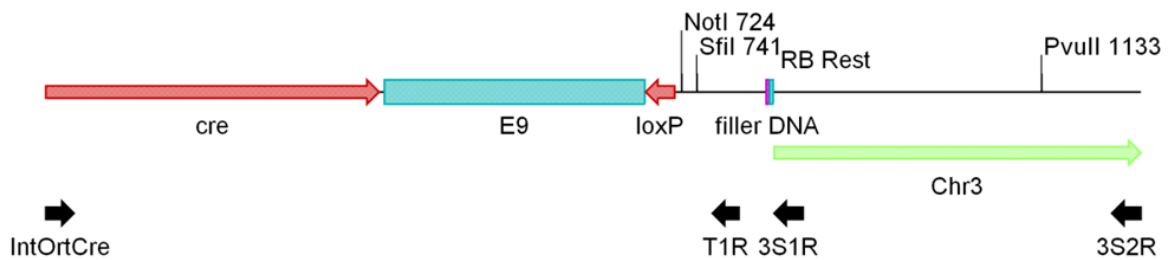


Abbildung 25: Schematische Darstellung des pGermlineEx1-3735 Integrationsort auf Chromosom 3

Nach der Auswertung der Ergebnisse der inversen PCR wurde eine zweite Integration in der Linie pGermlineEx1-3735 auf dem Chromosom 3 postuliert. Nach der Ableitung von genomischen Primern konnte die Integration der rechten Konstruktseite in einer direkten Amplifikation durch das Primerpaar IntOrtCre und 3S2R auf dem Chromosom 3 an Position 184164283 bestätigt werden. Die einzige Auffälligkeit bei dieser Integration ist die Insertion von 4 Cystein-Basen (violette Box) hinter dem ersten Basenpaar der Right Border Sequenz, von der noch vier weitere Basenpaare folgen (türkisfarbene Box), bevor die chromosomale DNA (grüner Pfeil) beginnt. Eine Amplifikation der Integration auf der linken Seite des Konstrukts blieb erfolglos. Primerbindestellen sind als schwarze Pfeile, die genomische DNA als grüner Pfeil und Gene sowie die Rekombinaseerkenntnissequenzen als rote Pfeile mit ihrer entsprechenden Orientierung dargestellt. Aberrationen des Integrationsortes sind in Violett dargestellt, im Falle von Konstruktbestandteilen in der jeweiligen Orientierung.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Konstrukt zu entwickeln, dass die unkontrollierte Verbreitung von transgenen Eigenschaften aus Maispflanzen in die Umwelt durch den Pollenflug unterbindet. Gleichzeitig sollte aber die Möglichkeit der einfachen züchterischen Handhabung gewährleistet bleiben. Dadurch sollte ein relevanter Beitrag für die Koexistenz von transgenen Pflanzen und konventionellen Pflanzen in der Landwirtschaft erarbeitet werden.

Um diese beiden Grundvoraussetzungen erfüllen zu können, wurden Konstrukte erstellt, die eine Kombination aus induzierbarer und gewebespezifischer Aktivität der Rekombinasesysteme Cre/*loxP* aus dem Bakteriophagen P1 und dem FLP/*FRT* System aus *Saccharomyces cerevisiae* enthielten. Die gewebespezifische Aktivität einer Rekombinase wurde dabei durch die Insertion einer zweiten, induzierbaren Rekombinase unterbunden. Die so inaktivierten Konstrukte sollten stabil in Mais transformiert und aus den entstehenden Pflanzen Saatgut erstellt werden. In der folgenden Generation sollte durch einen definierten Reiz, ausgelöst durch die Hitzeaktivierung des GmHSP17.5E Promotors, eine Rekombination im Konstrukt stattfinden, die den gewebespezifischen Promotor ZmMADS2 mit der zweiten Rekombinase zu einer Transkriptionseinheit verbindet. Diese Rekombinase sollte dann, durch eine weitere Exzisionsreaktion während der Pollenentwicklung die codierenden und regulierenden Teile des Konstrukts entfernen. In Auskreuzungsversuchen sollte die Effektivität dieser Methode überprüft und die erfolgreiche Exzision in den Nachkommen gezeigt werden.

4.1. Aufbau und Funktionsweise der Konstrukte

Die Verhinderung der unkontrollierten Auskreuzung transgener DNA-Sequenzen in die Umwelt sollte in diesem Fall durch den gekoppelten Einsatz der Rekombinasen Cre und FLP erreicht werden. In diversen Arbeiten konnten beide Rekombinasesysteme bereits in verschiedenen Pflanzen erfolgreich zur Eliminierung von Markergenen eingesetzt werden (unter anderem Cre: Zuo et al. 2001, Zhang et al. 2003, Kerbach et al. 2005; FLP: Fladung et

al. 2010, Akbudak und Srivastava, 2011, Herzog et al. 2012). Die grundlegenden Neuerungen in dem hier vorgestellten Konstruktaufbau bestanden aus der Kombination von induzierbarer und gewebespezifischer Expression der Rekombinasen und der finalen Entfernung sämtlicher kodierender oder regulierender Sequenzen aus dem Wirtsgenom.

Als aktivierbarer Promotor wurde der Promotor GmHSP17.5E aus der Sojabohne (Czarnecka et al. 1984) genutzt, der in ähnlichen Ansätzen (Fladung et al. 2010 in Pappeln, Wang et al. 2005 in Tabak und Zhang et al. 2003 in Mais) schon erfolgreich für die durch Hitze induzierte Exzision von Genkassetten eingesetzt worden war. Die gewebespezifische Aktivierung der zweiten Rekombinase wurde durch den Promotor ZmMADS2 aus Mais kontrolliert, der in Expressionsstudien eine hochspezifische Aktivität während der späten Pollenentwicklung zeigte (Schreiber et al. 2004). Als Selektionsmarker für die *in vitro* Kultur wurde das *bar* Gen eingesetzt, um eine zuverlässige Selektion von transgenem Gewebe zu ermöglichen. Zusätzlich wurde noch das Reportergen *uidA* genutzt, um eine schnelle und nicht letale Selektion zwischen Pflanzen mit transgenem und Wildtyp Phänotyp zu ermöglichen.

Generell waren die Konstrukte in zwei Bereiche aufgeteilt. Auf der linken Seite der T-DNA lagen die beiden Markergene, die zusätzliche Eigenschaften an die Pflanze vermittelten (Gluphosinat Resistenz und β -Glucuronidase Aktivität). Auf der rechten Seite lagen die Rekombinationskassetten, die die Weitergabe der transgenen Eigenschaften und den Verbleib des Konstrukts im Pflanzengenom regulieren sollten. Während die Selektionsmarker konstitutiv exprimiert wurden, war die gewebespezifische Aktivität der zweiten Rekombinase durch ein Aktivierungselement unterdrückt, das den ZmMADS2 Promotor und die dazugehörige Rekombinase trennte. Das Aktivierungselement bestand aus einer weiteren Rekombinase unter der Kontrolle des Hitze induzierbaren Promotors GmHSP17.5E, wobei das Aktivierungselement eingefasst von entsprechenden Rekombinaseerkennungsequenzen invers im Konstrukt lag, so dass die dazugehörige Terminationssequenz hinter dem gewebespezifischen Promotor positioniert war. Dieses wurde für nötig erachtet, damit eine Expression der aktivierenden Rekombinase nicht durch den gewebespezifischen Promotor vorzeitig ausgelöst werden konnte.

Nach der Transformation der Pflanzen und der Erstellung von Saatgut sollte durch eine Hitzebehandlung die Expression der ersten Rekombinase ausgelöst werden. Diese würde durch eine Exzision das Aktivierungselement, bestehend aus dem Promotor GmHSP17.5E,

der ersten Rekombinase und der Terminationssequenz, aus dem integrierten Konstrukt entfernen. Dadurch würde die zweite Rekombinase unter die Kontrolle des pollenspezifischen Promotors ZmMADS2 gebracht werden. Dessen Aktivität während der Pollenbildung führt in diesen Geweben zu der Expression der zweiten Rekombinase, was aufgrund der am äußeren Rand der T-DNA liegenden Erkennungssequenzen zu einer weiteren Exzision führt, bei der die codierenden und regulierenden Sequenzen aus der T-DNA entfernt werden. Nur ein funktionsloser Rest von etwa 500 bp, bestehend aus den Left und Right Border Sequenzen, Sequenzen des Vektorgrundgerüsts und eine Erkennungssequenz der zweiten Rekombinase würden im Genom der Pflanze verbleiben. Die Pflanze würde ihre zusätzlichen Eigenschaften verlieren und wäre phänotypisch nicht von einer normalen Maispflanze zu unterscheiden.

4.2 Adaptation der FLP Rekombinase

Für die erfolgreiche Durchführung der einzelnen Rekombinationen war eine hohe Effizienz der jeweiligen Rekombinasesysteme notwendig. Während das Cre/*loxP* System in vorangegangenen Arbeiten eine verlässliche Rekombination in Maisgeweben zeigte (Yuan et al. 2004 und Kerbach et al. 2005), konnte bei transienten Experimenten nur eine sehr geringe Aktivität der FLP Rekombinase in Maisembryonen beobachtet werden (siehe Ergebnisse 3.1.1). Die niedrige Aktivität des FLP Systems würde sowohl bei der Aktivierung der Konstrukte (pPollenEx2, pGermlineEx1/2) als auch bei der finalen Rekombination unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors (pPollenEx1) die Funktionalität der Konstrukte gefährden.

Versuche von Song und Niederweis (2007) zeigten die zuverlässige Funktionalität des FLP/*FRT* Systems bei Markerexzisionen in *Mycobacterium smegmatis*. Bei dem Versuch das System auf *Mycobacterium bovis* BCG oder *Mycobacterium tuberculosis* zu übertragen mussten sie eine deutlich reduzierte Effektivität der FLP Rekombinase feststellen. Eine unzureichende Genexpression in heterologen Systemen kann verschiedene Auslöser haben. Neben der Auswahl von Promotorsequenzen kann eine ineffiziente Transkription des Gens zu einer schlechten Expression führen. Intensive Studien der Expression von heterologen

Genen in *E.coli* zeigten, dass nicht nur die optimale Shine-Dalgarno-Sequenz die Translationseffizienz beeinflusst, sondern auch Sequenzen direkt nach dem Translationsstart einen deutlichen Effekt auf die Translation ausüben können. Stenström und Mitarbeiter (2001) konnten durch stille Mutationen in den ersten 15 bp des *lacZ* Gens, deutliche Unterschiede in der Expression hervorrufen und sogar schwache Shine-Dalgarno-Sequenzen durch Optimierung des zweiten Codons ausgleichen. Auch sekundäre Strukturen der mRNA können zu Veränderungen der Expressionstärke führen. So konnten Yarchuk und Mitarbeiter (1992) zeigen, dass die Ausbildung von Haarnadelstrukturen zwischen der 5'UTR und dem ersten Kodon des *lacZ* Gens die Initialisierung des Translationskomplexes behindert und so die Degradation der mRNA durch die RNaseE begünstigt. Darüber hinaus konnten Schwankungen in der Expressionstärke auf eine inkompatible Verteilung der Nutzung bestimmter tRNAs zurückgeführt werden. In *E.coli* konnte das Auftreten von den seltenen Kodons wie zum Beispiel AGG/AGA mit einer drastischen Reduktion in der Expression, aber auch in einer reduzierten Proteinqualität, Verschiebungen im Leseraster, Aminosäuresubstitutionen und Translationsabbrüchen korreliert werden (zur Übersicht: Kane, 1995). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurde zum Beispiel durch Brinckmann und Mitarbeitern (1989) für die Expression von verschiedenen Proteinen, wie einen Plasminogen Aktivator, die Pro-Urokinase oder das gp41 des HI-Virus eine Kotransformation mit *dnaY* durchgeführt. Dieses führte zu einer Supplementation mit der tRNA^{Arg}_{AGA/AGG} und zu einer deutlichen Steigerung der Expressionseffizienz. Neben der zusätzlichen Expression von seltenen Kodons wurden aber auch in verschiedenen Ansätzen die mRNA Sequenzen direkt verändert. So konnte durch das Entfernen von AGG-Dimeren eine bis zu 40fach erhöhte Expression von menschlichem kardialem Tropin T in *E.coli* erreicht werden (Hu et al. 1996). Auch die Adaption der Kodonzusammensetzung des *gfp* Gens aus *Aequorea victoria* konnte dessen Expression in Retinazellen aus Meerschweinchen um den Faktor 22 steigern (Zolotukhin et al. 1996). Die Gene *cryIA(b)* und *cryIA(c)* aus *Bacillus thuringiensis* von Perlak und Mitarbeiter (1991) wurden für den Einsatz in der Biotechnologie einer intensiven Anpassung an das pflanzliche Genom unterzogen. Eine genaue Analyse der Gensequenzen zeigte eine signifikante Abweichung in der generellen Genstruktur. Kritischen Merkmale dieser Unterschiede waren der G/C-Gehalt, das Vorkommen von A/T-reichen Sequenzen, die eine hohe Ähnlichkeit zu Introns besaßen, Polyadenylierungssequenzen aus dem pflanzlichen System, RNA destabilisierende Motive (ATTTA) und darüber hinaus das häufige

Auftreten von im Wirt seltenen Kodons. Nach der vorläufigen Mutation der Gene, die die Polyadenylierungssequenzen und die kritischen A/T- reichen Bereiche entfernte, konnte bereits eine bis zu 10fache Erhöhung des Proteingehalts in transformierten Tabak und Tomatenpflanzen erreicht werden. Die vollständige Mutation der Gene umfasste, neben den vorrangegangenen Verbesserungen, die Adaption der Kodonzusammensetzung, aber auch die Optimierung von der sekundär Struktur der RNA und potentiell regulierenden Sequenzen. In den folgenden transformierten Pflanzen konnte, im Vergleich zum ursprünglichen Gen, ein bis zu 100fach erhöhter Gehalt an Genprodukt nachgewiesen werden.

Die grundlegenden Überlegungen zur Expressionsoptimierung in heterologen Systemen können generell in sechs Schritten zusammengefasst werden (Gustafsson et al. 2004). Als erstes sollte die Kodonnutzung des Wirtsgenoms untersucht werden, unter Umständen sogar explizit für stark exprimierte Gene. Kodons, die in unter 5 % der Fälle verwendet werden, sollten vermieden und auf die anderen synonymen Kodons umverteilt werden. Je nach Wirtsorganismus kann es auch bestimmte Kodondimere geben, die die Translation behindern und während der Optimierung entfernt werden sollten. Repetitive Sequenzen, sowie Sequenzen die unvorteilhafte Sekundärstrukturen erzeugen können, sollten entfernt werden. Für die Klonierungsstrategie können zusätzlich noch Schnittstellen für Endonukleasen entfernt oder hinzugefügt werden. Als Letztes können besondere Eigenschaften wie kryptische Spleiß-Stellen berücksichtigt werden. Diese grundlegenden Vorschläge zu einer effektiven Expressionsoptimierung (Perlak et al. 1991 und Gustafsson et al. 2004) wurden angewandt, um die Expression der FLP in Mais zu verbessern.

Nach dem Abgleich der nativen FLP Sequenz mit der Kodonnutzung von Mais (www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577) wurden seltene Triplets der Sequenz durch die jeweils zwei häufigsten vom Mais genutzten Triplets ersetzt. Zusätzlich wurden drei potentielle Polyadenylierungsstellen (AATAAA, Position 220-225, 802-807 und 850-855) zusammen mit vier RNA destabilisierenden Motiven (ATTTA, Position 119-123, 303-307, 510-514 und 606-610) aus der codierenden Region entfernt und der G/C-Gehalt von etwa 37 % auf etwa 55 % angehoben. Im Zuge dessen wurden auch einige störende Schnittstellen für die folgenden Klonierungsschritte entfernt. Insgesamt wurden 28 % der 1272 bp der FLP Rekombinase verändert. Nachdem die native Sequenz der FLP Rekombinase

nur eine relative Rekombinationseffizienz von 2,2 % erreichte, konnte nach der Anpassung der Sequenz eine Steigerung der relativen Rekombinationseffizienz auf 65,3 % erreicht werden. Die nachträgliche Ausstattung der Sequenz mit dem STLS-1 Intron führte zu einer weiteren Steigerung der relativen Rekombinationseffizienz auf 75,2 %. Diese deutliche Steigerung um den Faktor 34 der Aktivität in Maisgeweben sollte die Effektivität des Konstrukts deutlich erhöhen.

Da einige Arbeiten eine niedrige Bindekapazität der FLP an ihre Erkennungssequenz (Ringrose et al. 1998), sowie eine geringere Stabilität des Proteins im Vergleich zu der Cre Rekombinase (Buchholz et al. 1996) aufzeigen konnten, gibt noch weitere Möglichkeiten der Systemoptimierung. Buchholz und Mitarbeiter (1998) konnten durch zyklische Mutagenese in der achten Generation eine vierfach Mutante der FLP (P2S, L33S, Y108N und S294P) erzeugen, die eine erhöhte Thermostabilität zeigte. Da die durchgeführten Versuche keine Thermostabilität verlangten wurde auf die Nutzung dieser sogenannten FLPe Rekombinase verzichtet. Akbudak und Srivastava (2011) konnten aber im Reis eine grundsätzlich erhöhte Rekombinaseaktivität der FLPe nachweisen, im Vergleich zu der ursprünglichen FLP Rekombinase und auch im Vergleich zu einer für das Maussystem optimierten FLPe. Daher sollte für zukünftige Arbeiten die Proteinmutationen der FLPe gemeinsam mit einer Sequenzoptimierung für eine Expression im Mais berücksichtigt werden.

4.3 Hitzeschockaktivierung der Konstrukte

Die grundlegende Funktionsweise der Konstrukte war es, während der Pollenentwicklung (später auch während der generellen Gametenentwicklung) die transgenen regulativen und proteinkodierenden Eigenschaften zuverlässig aus dem Genom der Pflanzen zu entfernen. Damit eine Züchtung der Linien und der Erhalt von Saatgut möglich war, wurden die Konstrukte durch die Integration eines Aktivierungselements und die dadurch bedingte Trennung von gewebespezifischen Promotor und der Rekombinase inaktiviert. Das integrierte Aktivierungselement bestand aus einer durch Hitze induzierbaren Rekombinase, die nach der Aktivierung mittels Autoexzision das gesamte Aktivierungselement entfernen

sollte und so den gewebespezifischen Promotor wieder in regulierende Nähe zu der zweiten Rekombinase setzen sollte.

4.3.1 Ermittlung der Aktivierungsbedingungen des Promotors GmHSP17.5E

Nach der Transformation der Konstrukte wurden die erforderlichen Bedingungen für die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors in Mais getestet. Für die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors konnten in einer Literaturrecherche diverse Aktivierungsprotokolle gefunden werden, die sich auf verschiedenste Gewebe und Pflanzen bezogen. Die Isolierung und Charakterisierung des GmHSP17.5E Promotors wurde von Czarnecka und Mitarbeitern (1985) nach einer zwei stündigen Hitzebehandlungen von Sojakeimlingen bei einer Temperatur von 40°C durchgeführt. Auch in heterologen Systemen konnte die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors durch eine Hitzebehandlung bestätigt werden. So wurden in *Arabidopsis thaliana* die Aktivierung und Expressionsstärke in den Reproduktionsorganen untersucht (Crone et al. 2001). Dabei reichte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C aus, um nach einer zwei Stündigen Regeneration bei Explantaten eine Expression der β -Glucuronidase nachweisen zu können. Differenziert betrachtet konnte aber in einigen Geweben wie zum Beispiel den Kronblättern keine Induktion nachgewiesen werden. In Staubblättern und dem Pistillum konnte erst ab einer gewissen Entwicklungsstufe eine erfolgreiche Hitzeaktivierung nachgewiesen werden. Für die Induktion von Rekombinationen konnte der GmHSP17.5E unter anderem in Tabakblättern und Samen erfolgreich eingesetzt werden. Wang und Mitarbeiter (2005) konnten durch eine dreimalige Inkubation bei 42°C für 2 Stunden mit Hilfe der FLP Rekombinase Exzisionsraten von 40 -70 % erreichen. Die Induktion von Rekombinationsereignissen konnte auch in Pappeln (Fladung et al. 2010) mit Hilfe des GmHSP17.5E Promotors nach einer Inkubation von drei Stunden bei 42°C nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Aktivierung des GmHSP17.5E in Maiskalluskulturen und Protoplasten wurden nach einer Inkubation bei 42°C für 2 Stunden durch einen GUS-Aktivitätstest nachgewiesen (Lyznik et al. 1995). Gleichzeitig wurde auch die Dauer der hitzeinduzierten GUS-Aktivität nach einer 3 stündigen Inkubation bei 42°C bestimmt. Die Kalluskulturen zeigten noch nach 16 Stunden Regeneration eine erhöhte GUS-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Diese sind aber nur bedingt aussagekräftig, da die geschätzte

Halbwertszeit der β -Glucuronidase in Mesophyllprotoplasten mit etwa 50 Stunden angegeben wird (Jefferson et al. 1987). Gleichzeitig wurden auch Rekombinationsversuche mit einer hitzeinduzierbaren FLP Rekombinase durchgeführt. Hierbei konnte die Aktivierung der FLP und eine folgende Rekombination nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C in Maiskalluskulturen gezeigt werden. Eine genauere Eingrenzung der optimalen Hitzeschockbedingungen wurde von Herzog und Mitarbeitern (2012) durchgeführt. Hierbei wurde die induzierte Expression der FLP Rekombinase in Äpfeln bei unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiten überprüft. Während die optimalen Aktivierungstemperatur des GmHSP17.5E Promotors anhand von GUS Färbungen und RT-PCR Analysen für Apfelpkulturen auf 42°C festgelegt werden konnte, musste eine deutliche Abnahme in der Vitalität der Pflanzen ab einer Inkubationsdauer von 6 Stunden festgestellt werden, wobei mit andauernder Inkubation aber auch der Anteil an aktiviertem Gewebe zunahm. Trotzdem wurden die folgenden Hitzeschockbehandlungen auf 4 Stunden beschränkt, um eine Schädigung der Pflanzengewebe zu minimieren. Während die generelle Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors in pflanzlichem Gewebe vielfach bestätigt worden ist und die optimale Aktivierungstemperatur meist bei 42°C angesetzt wurde, konnte die Dauer der hitzeinduzierten Expression nur von Lyznik und Mitarbeitern (1995) anhand von Aktivitätsmessungen der β -Glucuronidase abgeschätzt werden, wobei diese Ergebnisse aufgrund der Stabilität des Proteins als zweifelhaft anzusehen sind. Daher wurden die Parameter für eine induzierte Expression in Maispflanzen anhand der Linie (pPollenEx1-237) neu definiert. Hierbei wurde in 14 Tage alten Pflanzen nach Hitzeapplikation die Transkription und Translation der Cre Rekombinase nachgewiesen. Die Untersuchungen (Ergebnisse 3.3.1) zeigten schon nach einer Inkubation für zwei Stunden bei einer Temperatur von 37°C eine beginnende Expression der Cre Rekombinase. Bei 42°C konnte eine deutliche Expression der Cre Rekombinase nachgewiesen werden, ohne dass erkennbare Schäden an den Pflanzen beobachtet werden konnten. Auch die Inkubation bei 45°C zeigte eine Expression der Cre Rekombinase, nach zwei Stunden Inkubation konnte aber schon eine deutliche Verschlechterung der Vitalität der Pflanzen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten eine generelle Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Hitzeaktivierung in Äpfeln (Herzog et al. 2012). Weitere Analysen sollten die Dauer der induzierten Aktivität des GmHSP17.5E Promotors durch den kontinuierlichen Nachweis der *cre* mRNA eingrenzen. Während die Anwesenheit von induzierter mRNA bislang in

Apfelkulturen und Maisprotoplasten (Herzog et al. 2012 und Lyznik et al. 1995) nachgewiesen wurde, konnte die konkrete Dauer der Expression nach einer Aktivierung nicht endgültig definiert werden. In dieser Arbeit konnte noch 22 Stunden nach einem Hitzeschock eine anhaltende Expression der Cre Rekombinase nachgewiesen werden (siehe Abb.11). In einigen Maislinien mit dem Konstrukt pPollenEx1, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden, konnte eine linienabhängige Dauer der *cre* Expression von 36 und sogar 48 Stunden gezeigt werden (Dr. Becker, mündliche Mitteilung). Bei vergleichbaren Arbeiten zu der hitzeinduzierten Expression der Hitzeschockproteine HSP18.1 und HSP17.9 aus Erbsen (DeRoche et al. 1991) war die Expression der Proteine bereits nach 16 Stunden kaum noch in Northern Blot Analysen nachzuweisen. In Western Blot Analysen (Ergebnisse 3.3.2) konnte die Anwesenheit der Cre Rekombinase bereits eine Stunde nach der Hitzeschockbehandlung nachgewiesen werden. Diese schnelle Reaktion auf eine Hitzebehandlung deckt sich mit verschiedenen anderen Ergebnissen. Die nativen Hitzeschockproteine in Erbsen, PsHSP18.1 und PsHSP17.9 konnten nach zwei Stunden im Western Blot Experiment bestätigt werden (DeRoche et al.1991). Auch die hitzeinduzierte Expression der β -Glucoronidase in Maiskalluskulturen von Lyznik und Mitarbeitern (1995) zeigte nach einer bis zwei Stunden Hitzeinkubation einen plötzlichen und deutlichen Anstieg an GUS Aktivität, der auch nach dem Hitzeschock weiterhin anhielt. Während bei den Western Blot Analysen von DeRoche und Mitarbeitern (1991) das Protein PsHSP18.1 nach einer Hitzeinkubation von zwei Stunden bei 38°C noch nach fünf Tagen in Rohextrakt der Erbsen nachweisbar war, konnte die Cre Rekombinase in dieser Arbeit nur bis zu 20 Stunden nach dem Hitzeschock detektiert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die hitzeinduzierte Expression der Cre Rekombinase nur in Blättern und den äußeren Bereiche der Pflanze nachweisbar war. Im Inneren der jungen Pflanze war es auch nach 48 Stunden Inkubation bei 42°C nicht möglich eine erfolgreiche Expression der Rekombinase mittels RT-PCR nachzuweisen. Southern Blot Analysen sollten nach der Verifizierung der Transkription und Translation der Cre Rekombinase die erfolgreiche Rekombination des Konstrukts in den 14 Tage alten Pflanzen nachweisen. Nach der einmaligen Applikation eines Hitzeschocks von 42°C für zwei Stunden in verschiedenen Linien konnte die Ausbildung eines chimären Genotyps in den Pflanzen sowohl mit dem Konstrukt pPollenEx1 ,als auch mit pPollenEx2 gezeigt werden. Die Auswertung der Southern Blot Experimente (siehe Abb.14) zeigen zwei spezifische Fragmente, sowohl für das rekombinierte, aber auch für das ursprüngliche, nicht

rekombinierte Konstrukt. Die unvollständige Rekombination nach einem Hitzeschock und die mangelnde Durchdringung der Hitzeschockaktivierung in die innen Gewebe der Pflanzen verhinderten eine zuverlässige Aktivierung der Konstrukte vor der Pollenentwicklung. Für die zuverlässige Aktivierung der Konstrukte in den Keimbahnen der Maispflanzen bedurfte es einer grundlegenden Überarbeitung der Hitzeschock Protokolle. Hierfür musste die Aktivierung der Konstrukte in einem anderen Entwicklungsstadium der Pflanze und zusätzlich unter anderen Rahmenbedingungen durchgeführt werden. Eine Aktivierung direkt im Pollen oder in den Tasseln wurde als zu riskant angesehen, da hier schon eine ähnliche Studie vorlag (Crone et al. 2001), in der eine mittels Hitzeschock ausgelöste GUS Aktivität in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* untersucht wurde. Diese Studie nutze auch den GmHSP17.5E und konnte keine Aktivität in Mikrosporen, Pollenmutterzellen, Eizellen und diversen anderen Geweben nachweisen. Alternativ wurden fortan zwei Tage alte Keimlinge eingesetzt, die für sechs Stunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt wurden, gefolgt von einer 18 Stunden andauernden Regenerationsphase. Die vergleichsweise lange Dauer der Hitzeinkubation (Zhang et al. 2003, 5 Stunden; Herzog et al. 2012, 4 Stunden; Fladung et al. 2010, 3 Stunden; Wang et al. 2005, 2 Stunden) sollte die vollständige Erwärmung des Gewebes der jungen Keimlinge bewirken, um die Aktivierung des GmHSP17.5E Promotors auch im inneren des Keimlings gewährleisten zu können. Die wiederholte Applikation eines Hitzeschocks zur Verbesserung der Exzisionsraten in Tabakblättern wurde von Wang und Mitarbeitern (2005) für die Autoexzision von Markergenen mit Hilfe des Cre//loxP Systems eingesetzt. Um auch in den Maiskeimlingen eine vollständige Exzision des Aktivierungselements aus sämtlichen Geweben erreichen zu können, wurde eine Sequenz von vier aufeinander folgenden Hitzeschockbehandlungen durchgeführt. Diese Prozedur sollte dazu führen, dass in Zellen, die während der ersten Hitzebehandlung noch keine Exzision aufwiesen, in den folgenden Aktivierungen das Aktivierungselement aus dem Konstrukt entfernt werden kann. Die Effektivität dieser Methode konnte bei diversen Linien bestätigt werden. So konnten für die 16 Linien mit dem Konstrukt pPollenEx1 bei Nachkommen von 12 Linien (75 %) eine vollständige Aktivierung nachgewiesen werden. Versuche mit 14 Linien, die das Konstrukt pPollenEx2 trugen, ergaben in 11 Linien (79 %) vollständig aktivierte Nachkommen. Hierbei muss erwähnt werden, dass die vollständige Aktivierung der Konstrukte zwar eine Linienabhängigkeit in der generellen Tendenz der Aktivierbarkeit zeigte, aber auch in Linien, bei denen eine vollständige Aktivierung gezeigt

werden konnte, zeigten einige Schwesterpflanzen trotzdem einen chimären Genotyp. Dieses deckt sich auch mit den generellen Ergebnissen von Wang und Mitarbeitern (2005), bei denen nach der sequenziellen Hitzeaktivierung von Tabakblättern aus diesen neue Pflanzen regeneriert wurden. In diesen Versuchen konnte zwar die vollständige Exzision von Markergenen in den regenerierten Pflanzen nachgewiesen werden, der Anteil an Regeneraten mit vollständiger Markergeneeliminierung lag aber zwischen 47 % und 79 % und zeigte auch eine Linienabhängigkeit. Dieser Linieneffekt wurde durch einen Positionseffekt des Integrationsortes im Genom auf die Expression der Cre Rekombinase erklärt. Für die effektive Aktivierung einer Pflanzenlinie in einem landwirtschaftlichen Maßstab wäre die Aktivierung über einen Hitzeschockpromotor, mit einer ähnlichen Prozedur wie hier beschrieben, natürlich nicht durchführbar. Während der kontrollierte Einsatz eines stressassoziierten Promotors durch die gut regulierten Anzuchtbedingungen im Labor oder Gewächshaus möglich ist, stellen Schwankungen in den Anzuchtbedingungen, wie Bodenbeschaffenheit, schwankende Wetterbedingungen und Schädlingsbefall, im Freiland eine große Herausforderung für ein induzierbares Promotorsystem dar. Eine mögliche Alternative wäre die Aktivierung über eine chemische Induktion, wie sie in der Literatur schon oft beschrieben wurde. Für die theoretische Beschaffenheit eines solchen Promotors wurden schon grundlegende Rahmenbedingungen definiert (Gatz, 1997). Zu der wichtigsten Voraussetzung eines aktivierbaren Systems gehört unter anderem die Exklusivität der Aktivierung, was bedeutet, dass der Promotor generell keine Aktivität aufweisen darf, weder bei physiologischem Stress noch während der pflanzlichen Entwicklung, bis ein genau definierter Reiz eine starke Aktivierung des Promotors auslöst. Eine solche reizauslösende Chemikalie muss darüber hinaus weitere Grundvoraussetzungen erfüllen können. Sie sollte für die zuverlässige Aktivierung der Gewebe systemisch in der Pflanze verteilt werden, eine Aktivierung auch in geringer Dosis vermitteln und dabei keine negativen Nebenwirkung in der Pflanze oder im Ökosystem haben. Zusätzlich sollten die Handhabung sowie die Applikation im Feld gefahrlos und einfach sein. Bislang wurde eine Bandbreite an chemisch induzierbaren Promotoren in Pflanzen getestet. Ein gängiges System für die Aktivierung neben dem Hitzeschocksystem ist das Salizylsäuresystem, mit dem Promotor TnPR-1a (Beilmann et al. 1991) aus Tabak. Dieser Promotor konnte unter Einsatz von verschiedenen Chemikalien induziert werden, wie zum Beispiel Acetylsalizylsäure, Ethylen, Xylanase (zu Übersicht Gatz 1997). Die Bandbreite an aktivierenden Chemikalien, aber auch die

grundlegende Aktivität des Promotors als Teil der Pathogenantwort führen dazu, dass der Einsatz eines solchen Promotors für das hier vorgestellte System unter Feldbedingungen ungeeignet ist. Auch der Einsatz bedenklicher Stoffe für die Aktivierung der Konstrukte wie etwa Hormonderivate (β -Estradiol/XVA-System, Zuo et al. 2001; Dexamethason/ LBD-Steroidrezeptor, Schaart et al. 2004) oder Antibiotika (Tetrazyklin Transaktivator System, Weinmann et al. 1994) scheinen keine angemessene Alternative darzustellen. Es konnten bakterielle Regulationssysteme, wie etwa das BarA/BARE System aus *Streptomyces virginiae*, in Tabakprotoplasten transferiert werden (Shindo et al. 2006) und dort durch Zugabe einer 1 μ M Lösung von γ -Butyrolakton, einem sogenannten Virginiae Butanolid, aktiviert werden. Der Einsatz dieses spezifischen Repressorsystems ähnelte in seiner Adaption für den Einsatz in Pflanzen an das Tetrazyklin Repressor System (Weinmann et al. 1994). Der Vorteil besteht darin, dass die aktivierende Chemikalie an sich keine antibiotische Wirkung besitzt, sondern nur die Expression von Virginiamycin in den entsprechenden Bodenbakterien auslösen kann. Trotzdem bleibt die Aktivierung durch derartige Chemikalien in ihrer großflächigen und wiederholten Anwendung in der freien Natur fragwürdig. Eine Alternative hierzu stellen Systeme dar, die auf den Einsatz gängiger Pflanzenschutzmittel reagieren. In der heutigen Landwirtschaft wird regelmäßig eine Bandbreite an verschiedenen Chemikalien eingesetzt, um Begleitvegetation zu reduzieren und einen Fraßschutz zu gewährleisten (Hossain et al. 2004, Huang et al. 2005 sowie Brookes und Barfoot, 2010 Appendix B). So konnte zum Beispiel das GST-II-27 System aus Mais (Bridges et al. 1993) erfolgreich für eine Exzision in Tabak mit dem Rekombinasesystem R/RS eingesetzt werden (Sugita et al. 2000). Die Exzision in Tabakstecklingen wurde durch die Zugabe des Herbizidantidots R29148 (30 mg/l) ausgelöst und es konnte in 88 % der folgenden Knospen eine erfolgreiche Rekombination nachgewiesen werden. In einem anderen Ansatz wurde der ZmIn5-2 Promotor aus Mais von Yuan und Mitarbeitern für Induktion des Cre//loxP Systems in Tabak eingesetzt (2004). Die Aktivierung der Exzision in Tabakexplantaten wurde durch die Zugabe von 0,2 g/l 2-Chloro-N-(Methylaminocarbonyl) Benzensulfonamid, einem Chloroacetanilid Herbizid, ausgelöst und erreichte eine Rekombinationsrate von 93,8 %. Die genauen Wirkweisen von vielen Herbizidgegengiften und auch die molekularen Mechanismen der natürlichen Herbizidresistenzen sind für viele Stoffe bislang noch nicht geklärt (Scott-Craig et al. 1998). Der Einsatz von aktivierenden Chemikalien, die für die Landwirtschaft freigegeben wurden und deren großflächiger Einsatz zur Flurbereinigung oder ähnlichem stattfindet, stellt eine

gute Alternative zu anderen Chemikalien dar, weil durch die wiederholte Anwendung eine vollständige Aktivierung der Konstrukte gesichert wäre und eine zusätzliche Kontamination der Umwelt verhindert wird. Die Möglichkeiten der Bioinformatik und synthetischer Biologie könnten, durch die Kombination von verschiedenen aktivierbaren Systemen und der Optimierung bestehender induzierbarer Strukturen, einen landwirtschaftlich einsetzbaren Promotor erschaffen, der die zuverlässige Aktivierung von Konstrukten im Feldversuch gestattet.

4.4 Gewebespezifische Expression der zweiten Rekombinase

Gewebespezifische Promotoren sind für die Erforschung entwicklungsbiologischer Abläufe, aber auch für die Biotechnologie von großem Interesse. Die Entdeckung von gewebespezifischen Promotoren ergab sich aus der Analyse von Mutanten mit gewebespezifischen Merkmalen (Patterson, 2001), der Untersuchung von Integrationsorten in denen ein promotorloses Gen der T-DNA nach der Transformation eine Expression zeigte (Koncz et al. 1989), sowie vergleichende Analysen von gewebespezifischen cDNA Banken (Oldenhof et al. 1996). Die Verifikation der Promotorsequenzen und ihrer Expressionsmuster konnte durch den Einsatz von Reportergenen, wie zum Beispiel der β -Glucuronidase (Jefferson et al. 1987), leicht und mit hoher Auflösung im Gewebe bestätigt werden. In verschiedenen Ansätzen konnte eine Bandbreite an verschiedenen Promotorregionen definiert werden und deren Aktivität oftmals auch in transgenen Ansätzen bestätigt werden (Edwards und Coruzzi, 1990). Gleichzeitig wurden aber auch Abweichungen der gewebespezifischen Expression festgestellt, so führte die Transformation der Promotorregionen einer zytosolspezifischen Glutaminsynthetase aus Erbsen (GS3A) in Tabak zu Abweichungen in der erwarteten Expression. Das Expressionsmuster wechselte von einer Expression in Kotyledonen, Keimlingen und stickstofffixierenden Wurzelknollen (Walker und Coruzzi, 1989) zu einer exklusiven Expression des Reportergens in vaskulären Elementen (Edwards et al. 1990). Für die Anwendung in der Biosicherheit von transgenen Pflanzen werden insbesondere pollen- oder samenspezifische Promotoren sowohl im homologen, aber auch heterologen System eingesetzt. Zum Beispiel konnte der pollenspezifische NTM19 Promotor (Oldenhof et al. 1996) aus Tabak erfolgreich für die Exzision von Markergenen mit

Hilfe des Cre/*loxP* Systems eingesetzt werden (Mlynárová et al. 2006). Die Verwendung von heterologen Promotoren in Tabak zur Eliminierung von Markergenen führten Luo und Mitarbeiter (2007) durch. Hierbei wurde durch die Promotoren BGP1 aus *Brassica campestris* (Xu et al. 1993), LAT52 aus *Lycopersicon esculentum* (Twell et al. 1990) und dem Promotor PAB5 aus *Arabidopsis thaliana* (Belostotsky et al. 1996) erfolgreich pollen- und samenspezifische Exzisionen ausgelöst.

Der in dieser Arbeit verwendete pollenspezifische Promotor ZmMADS2 wurde in Mais in seiner Aktivität definiert. Hierbei konnte in Northern Blot Analysen und Lokalisationsstudien mit Fusionsproteinen von Schreiber und Mitarbeitern (2004) eine exklusive Expression in den Antheren der Phase VIII und in reifen Pollen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine sehr schwache Expression in den Wurzelspitzen vermutet. Für den Promotor ZmPMEI wurde aufgrund von gewebespezifischen cDNA Analysen eine spezifische Expression nur in Pollenkörnern, im Pollenschlauch und in einigen Regionen des weiblichen Gametophyten postuliert (Prof. Dresselhaus, Universität Regensburg, persönliche Mitteilung). Detaillierte Analysen des Expressionsmusters stehen noch aus. Da aber dieses Expressionsmuster eine Erweiterung des Ziels der pollenspezifischen Eindämmung darstellte, in dem es die Weitergabe von transgenen Eigenschaften über die Körner verhindern könnte, wurden auch Konstrukte mit diesem Promotor ausgestattet.

4.5 Auskreuzungsversuche

In den Auskreuzungsversuchen wurde der Pollen von transgenen Pflanzen zum Bestäuben von Kolben der nicht transgenen Linie A188 eingesetzt. Je nach Menge des verfügbaren Pollens wurde teilweise auch mehr als ein Kolben bestäubt, um eine möglichst große Menge an Nachkommen zu erhalten. Zusätzlich wurden Kolben von Pflanzen mit dem Konstrukt pGermlineEx1 oder pGermlineEx2 mit Pollen von A188 Pflanzen bestäubt. Da generell hemizygoten transgenen Pflanzenmaterial für die Auskreuzungen eingesetzt wurde, war nach einer mendelschen Vererbung eine Weitergabe des transgenen Phänotyps in der Hälfte aller Nachkommen zu erwarten. Während der Auskreuzung des transgenen Pollens wurden Aliquote der einzelnen Linien aufgehoben, um eine Gus-Färbung durchzuführen. Dadurch

sollte die Exzision des Konstrukts im Pollen schon vor der Analyse der Nachkommen und die Abweichung der mendelschen Vererbung des transgenen Phänotyps überprüft werden. Alle getesteten Linien zeigten eine normale Segregation des transgenen Phänotyps in der etwa die Hälfte aller Pollenkörner eine positive GUS-Färbung zeigte (Abb.16). Vergleiche mit den späteren Auskreuzungsergebnissen und der histochemischen Analyse der Nachkommen zeigte, dass der Nachweis in Pollen keinen Rückschluss auf die Effektivität der Exzision zulässt. Die Aktivität der gewebespezifischen Promotoren bewirkt, gemessen an der Halbwertszeit der β -Glucuronidase von etwa 50 Stunden in Mesophyll Protoplasten (Jefferson et al. 1987), dass selbst nach der gewebespezifischen Exzision noch stabiles Enzym während der Auskreuzung in den Pollen vorliegt. Dieses konnte durch Wiederholen der Pollenfärbungen bestätigt werden. Nach der histochemischen Analyse der Kreuzungsnachkommen wurde der entsprechende Pollen von Linien mit signifikantem Auskreuzungsmuster erneut getestet und selbst Wochen nach der Bestäubung konnten noch GUS-Färbungen durchgeführt werden, die keine Auffälligkeiten in der Vererbung zeigen.

Nach einer statistischen Auswertung der Kreuzungsnachkommen (siehe 3.4.1) konnte in insgesamt 11 Linien Abweichungen von der erwarteten Vererbung aufgezeigt werden. Bei acht Linien betrug der Anteil von nicht transgenen Nachkommen in Kreuzungen über 90 %, so dass hier eine erfolgreiche Exzision postuliert wurde (pPollenEx1-139 (97,5 %), pPollenEx2-284 (100 %), pGermlineEx1-3402 (100 %), pGermlineEx1-3440 (90,7 %), pGermlineEx1-3715 (100 %), pGermlineEx1-3725 (100 %), pGermlineEx1-3735 (98,9 %), pGermlineEx1-3.3.8 (100 %) und pGermlineEx1-4711 (97,8 %)). In direkten Ansätzen konnte die erfolgreiche Exzision der Konstrukte über eine spezifische PCR in einigen der Nachkommen aufgezeigt werden (siehe 3.5.1). Dabei konnte aber bei zwei Linien (pGermlineEx1-3440 und pGermlineEx2-4711) trotz einer Nachkommenschaft mit unter 10 % transgenen Pflanzen die Exzision der Konstrukte nicht mittels PCR nachgewiesen werden. Dieses führte zu der Annahme, dass es während des Integrationsprozesses zu Veränderungen in den Randbereichen des Konstrukts gekommen war, die einen direkten PCR Nachweis unmöglich machen. Die Ergebnisse der Auskreuzungsversuche zeigen eindeutig die hohe Effektivität der eingesetzten Promotoren sowohl ZmMADS2 als auch ZmPMEI und ZmPMEI-UTR. Alle drei Promotoren waren in der Lage eine ausreichende Expression der Rekombinasen während der entsprechenden Gewebeentwicklung zu erzeugen und somit die Weitergabe der transgenen Eigenschaften verhindern. Sowohl die

FLP Rekombinase in dem Konstrukt pPollenEx1 (97,5 %) als auch die Cre Rekombinase in den Konstrukten pPollenEx2 (bis 100 %), pGermlineEx1 (bis 100 %) und pGermlineEx2 (bis 97,8 %) waren in der Lage die Weitergabe der transgenen Eigenschaften deutlich zu verringern oder ganz zu unterbinden. Ähnliche Versuche von Luo und Mitarbeitern (2007) zeigten in der Auswertung der verschiedenen Kreuzungen eine Bandbreite von möglichen Exzisionsverhältnissen, von keiner feststellbaren Rekombination bis hin zur vollständigen Exzision des Markergens. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich bei einer weiterführenden Literaturrecherche bei diversen Studien, sowohl für die FLP (Herzog et al. 2012 37 % in Äpfeln; Woo et al. 2009 13-41 % in Tabak; Kondrák et al. 2006 29 % in Kartoffeln; Hu et al. 2008 5,2-52 % in Reis) aber auch für die Cre Rekombinase (Kopertekh et al. 2004 48-82 % in *Nicotiana benthamiana*; Wang et al. 2005 30-80 % in Tabak; Verweire et al. 2007 83-100 % Arabidopsis, Cuellar et al. 2006 4,7 % in Kartoffeln). Eine derartige abgestufte Verteilung der Rekombinationseffizienz konnte in diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Von den insgesamt 34 Linien mit denen Auskreuzungen durchgeführt worden sind, konnten bei 20 Linien (pPollenEx1 fünf von sieben Linien, pPollenEx2 acht von elf Linien, pGermlineEx2 sieben von neun Linien) keine auffällige Abweichung der mendelschen Vererbungsregel festgestellt werden. Vier Linien zeigten nur eine geringfügige Abweichung in der Vererbung des transgenen Phänotyps mit einem Anteil an Nachkommen ohne transgenen Phänotyp von pPollenEx1-244 67 %, pPollenEx2-288 69 %, pGermlineEx1-387 70 % und pGermlineEx2-482 68 %. Insgesamt vier Linien zeigten eine starke Abweichung der erwarteten Vererbungsmuster mit einem Anteil an Nachkommen die einen transgenen Phänotyp aufwiesen von unter 10 %, darunter die Linien pPollenEx1-139 (2,4 %), pGermlineEx1-3440 (9,3 %), pGermlineEx1-3735 (1,1 %) und pGermlineEx2-4711 (2,2 %). Darüber hinaus konnten in fünf Linien pPollenEx2-284, pGermlineEx1-3.3.8, pGermline1-3715, pGermline1-3402 und pGermline1-3725 keine Vererbung des transgenen Phänotyps festgestellt werden. Im Vergleich der Konstrukte untereinander war zwar generell mit allen vieren eine effektive Exzision möglich, aber der Anteil an Linien mit hoher Exzisionseffektivität im Vergleich zu Linien ohne oder mit nur geringer Veränderung in den Vererbungsmustern lässt doch Unterschiede erkennen. Während die Konstrukte pPollenEx1, pPollenEx2 und pGermlineEx2 in nur jeweils einer Linie eine Weitergabe des transgenen Phänotyps zu über 90 % verhinderten, konnten bei dem Konstrukt pGermlineEx1 in den Auskreuzungen von sieben Linien sechs Linien Nachkommen erzeugen, in denen der transgene Phänotyp in weniger als

10 % nachzuweisen war. Diese Vergleiche lassen die Vermutung zu, dass der PME1 Promotor ohne 5'UTR für eine pollenspezifische Exzision besser geeignet ist, als der ZmMADS2 Promotor oder der PME1 Promotor mit dem 5'UTR. Die Einkreuzung von A188 Pollen in die Linien mit dem Konstrukt pGermlineEx1 oder pGermlineEx2, konnten für die Linien pGermlineEx1-3.3.8, pGermlineEx1-3715 und pGermlineEx2-4711 die hohe Exzisionsrate von über 90 % Nachkommen ohne transgenen Phänotyp bestätigen. Bei den Einkreuzungen in die Linien pGermlineEx1-3440, pGermlineEx1-3725 und pGermlineEx1-3402 konnte aber keine Exzision in den transgenen Embryonen nachgewiesen werden, obwohl die Auskreuzungen mit transgenen Pollen hochsignifikante Abweichungen gezeigt hatten. Da parallel Linien wie pGermlineEx2-4711 und pGermlineEx1-3715 in den Einkreuzungsversuchen mit A188 Pollen ihre Effektivität bestätigten, sind diese Unterschiede nicht auf das Konstrukt zurückzuführen, sondern allen Anschein nach auf den jeweiligen Integrationsort des Konstrukts und die damit zusammenhängenden Unterschiede in der Aktivität der Region, während der Entwicklung der männlichen und weiblichen Gameten.

Die große Bandbreite an Expressionsstärken von transgenen Schwesterpflanzen wird kontrovers diskutiert. Peach und Velten (1991) konnten in vergleichenden Studien von klonalen Kalluskulturen aus Tabak nur geringe Unterschiede in der Expressionsstärke von Reportergenen zwischen den einzelnen Einzelintegrationsorten feststellen. Auch Nagaya und Mitarbeiter (2005) beobachteten zwar in der Gesamtheit der transformierten *Arabidopsis* Pflanzen große Unterschiede in der GUS Aktivität eines stabil transformierten 35S:*uidA* Konstrukts, die Aktivitäten der definierten vollständigen Einzelintegrationen zeigten aber untereinander nur geringe Schwankungen. Die Integrationsorte der einzelnen Linien konnten über alle Chromosomen verteilt nachgewiesen werden. Ein deutlich negativer Positionseffekt konnte aber bereits in *Drosophila* und Hefen nachgewiesen werden (Matzke AJM und Matzke MA, 1998). Und auch die Integration in Bereiche mit wiederkehrenden Sequenzmotiven soll in der Lage sein, negative Auswirkungen auf die Expression und die Stabilität von Integraten zu haben (Iglesias et al. 1997). So konnten Fladung und Mitarbeiter den Zusammenhang zwischen der Reversion eines transgenen Phänotyps in einer Pappelkultur und einem instabilen und entarteten Integrationsorts nachweisen (1999).

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit ist es jedoch möglich die Effektivität der Rekombinase direkt zwischen zwei Geweben aufzuzeigen. Während die Exzisionsreaktionen in der Linie

pGermlineEx1-3715 sowohl in den Pollen als auch in den Embryonen vollständig stattfanden, konnte in einer anderen Linie mit dem gleichen Konstrukt pGermlineEx1-3402 eine vollständige Exzision nur in den Pollen gezeigt werden. In den Embryonen konnte keine erfolgreiche Entfernung der transgenen Eigenschaften nachgewiesen werden. Die differenzierte Effektivität der einzelnen Linien (pGermlineEx1-3402, pGermlineEx1-3440 und pGermlineEx1-3725) zwischen Pollengewebe und Embryonalgewebe lassen sich als Beleg für einen gewebespezifischen Positionseffekt deuten.

Die erfolgreiche Exzision der Konstrukte scheint in dieser Arbeit eher durch den spezifischen Integrationsort und dessen Einfluss auf die Expression der Konstrukte beeinflusst zu sein, als durch die Wahl des Promotors oder der Rekombinase. Um eine vollständige Exzision der verschiedenen Elemente des Konstrukts gewährleisten zu können, müssen sowohl während der Aktivierung durch einen Hitzeschock, als auch bei der finalen Rekombination während der Entwicklung der verschiedenen Gameten die transgenen Eigenschaften stark exprimiert sein.

4.6 Integrationsortbestimmung

Nachdem die erfolgreiche Exzision der Konstrukte nicht nur über die Segregationsverhältnisse, sondern in einigen Linien auch durch eine PCR nachgewiesen werden konnte, sollten detaillierte Analysen der Integrationsorte deren Stabilität während der Rekombinationsereignisse aufzeigen. Mittels inverser PCR wurde versucht die genomischen Randsequenzen der Integrationsorte zu amplifizieren und aus den erhaltenen Sequenzdaten wurde der Integrationsort im Pflanzengenom postuliert. Anhand der bekannten Sequenz der Maislinie B73 wurden neue Primer abgeleitet, die eine Verifikation beider Seiten der Integrationsstelle ermöglichen sollten. Die Ergebnisse der inversen PCR konnten für die Linien pGermlineEx1-3440, pGermlineEx1-3735, pGermlineEx1-3715 und pGermlineEx2-4711 bestätigt werden.

Während der Analyse der Integrationsereignisse konnten schon häufig beschriebene Phänomene beobachtet werden. Aufgrund der postulierten Integration durch Mikrohomologien im Bereich der Left und Right Border Sequenzen (Mayerhofer et al. 1991)

kommt es während des Einfügens der T-DNA häufig zum Verschmelzen der beiden Sequenzen, was einen Verlust von Sequenzbereichen nach sich ziehen kann, sowohl im Konstrukt, als auch von der genomischen DNA. Auch kommt es während der Integration durch den Reparaturmechanismus unter Umständen zu dem Einfügen von unspezifischen Sequenzen, sogenannter filler DNA (Gheysen et al. 1987). Bei unzureichenden Homologien zwischen den DNA Fragmenten wird vermutet, dass es zum Abbrechen von Vektorbereichen kommen kann. Detaillierte Analysen von Integrationsereignissen (Meza et al. 2002) in *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass die Mehrzahl der untersuchten Integrationsorte deutliche Veränderungen aufwies. Generell zeigten die T-DNA Fragmente Abbrüche an Left und Right Border Sequenzen, wobei ein häufiger Verlust von 22 bp Right Border Sequenz und der Verbleib der drei Nukleotiden 5'-CCA auf die präferierte 'nicking' Sequenz von VirD2 zurückgeführt wird. An der Left Border Sequenz konnten Deletionen von 0 - 894 bp mit einem Median von 44 bp gezeigt werden. Darüber hinaus wurden in einigen Linien sogenannte filler DNA Fragmente gefunden, die bis zu 292 bp groß waren, meist aber deutlich kürzer ausfielen (1- 50 bp). Weitere Veränderungen waren Deletionen von genomischer DNA an der Integrationsstelle, die bis zu 1,5 kbp Größe erreichten, sowie die Integration von bis zu 5 kbp Nicht-T-DNA Vektor Sequenz.

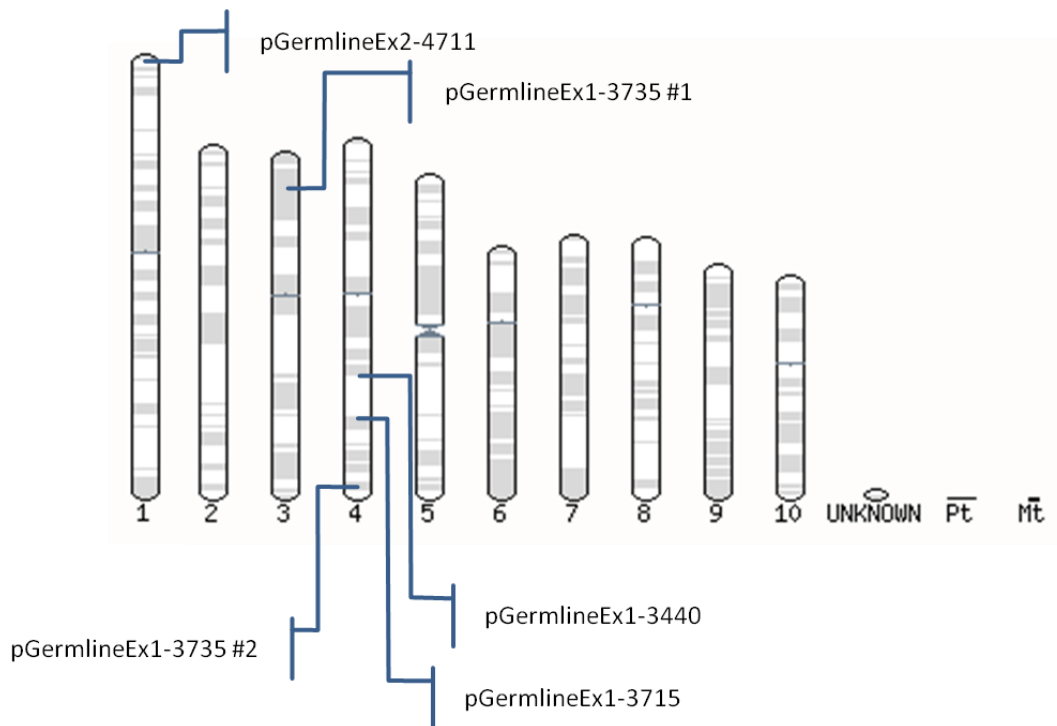


Abbildung 26: Lokalisation der T-DNA auf den verschiedenen Chromosomen von Mais

Nach der erfolgreichen Analyse der inversen PCR konnten die Integrationsorte in direkten PCR Ansätzen auf den verschiedenen Chromosomen im Mais bestätigt werden. Die Integration der T-DNA der Linie pGermlineEx2-4711 befindet sich am oberen Rand des Chromosom 1. Die zwei Integrationen der Linie pGermlineEx1-3735 konnten einmal auf dem oberen Arm von Chromosom 3 zu Ende des ersten Drittel nachgewiesen werden, die zweite Integration befand sich am unteren Ende des unteren Arms von Chromosom 4. Die T-DNA Integration der Linie pGermlineEx-3715 fand im unteren Arm auf Chromosom 4 am Ende des zweiten Drittels statt. Für die Linie pGermlineEx1-3440 befand sich der Integrationsort etwa mittig im unteren Arm von Chromosom 4.

Quelle: www.maizesequence.org

4.6.1 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440

Der Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3440 liegt auf dem Chromosom 4. Während die linke Seite des Konstrukts kaum Veränderungen zeigte, nur einen 35 bp großen Bereich an Filler DNA, welche die Verbindung zwischen der genomischen DNA und dem 15 bp Rest der Left Border Sequenz des Konstrukts darstellt, wurde auf der rechten Seite erhebliche Veränderungen im Konstrukt festgestellt. Die Integration auf der rechten Seite des Konstrukts zeigte eine etwa 600 bp große Duplikation des Left Border Bereichs, die nicht nur Teile einer weiteren Left Border Sequenz enthielt, sondern auch eine weitere *loxP* Sequenz. Ähnliche Phänomene konnten bei Integrationsortanalysen in Pappeln (Fladung, 1999),

gezeigt werden, wo in den Analysen auf der linken Seite des integrierten Konstrukts eine inverse Duplikation von Sequenzen der rechten Konstruktseite nachgewiesen werden konnte. Die detaillierte Analyse der finalen Rekombination konnte in Nachkommen mit revertiertem Phänotyp zeigen, dass die zusätzlich eingefügte *loxP* Sequenz für die Exzision des Konstrukts genutzt wird. Von acht Nachkommen konnte bei keinem die Nutzung der eigentlich vorgesehenen *loxP* Sequenz nachgewiesen werden, das auch die mangelnden positiven Ergebnisse in dem direkten PCR Versuch (siehe 3.5.1) erklären würde.

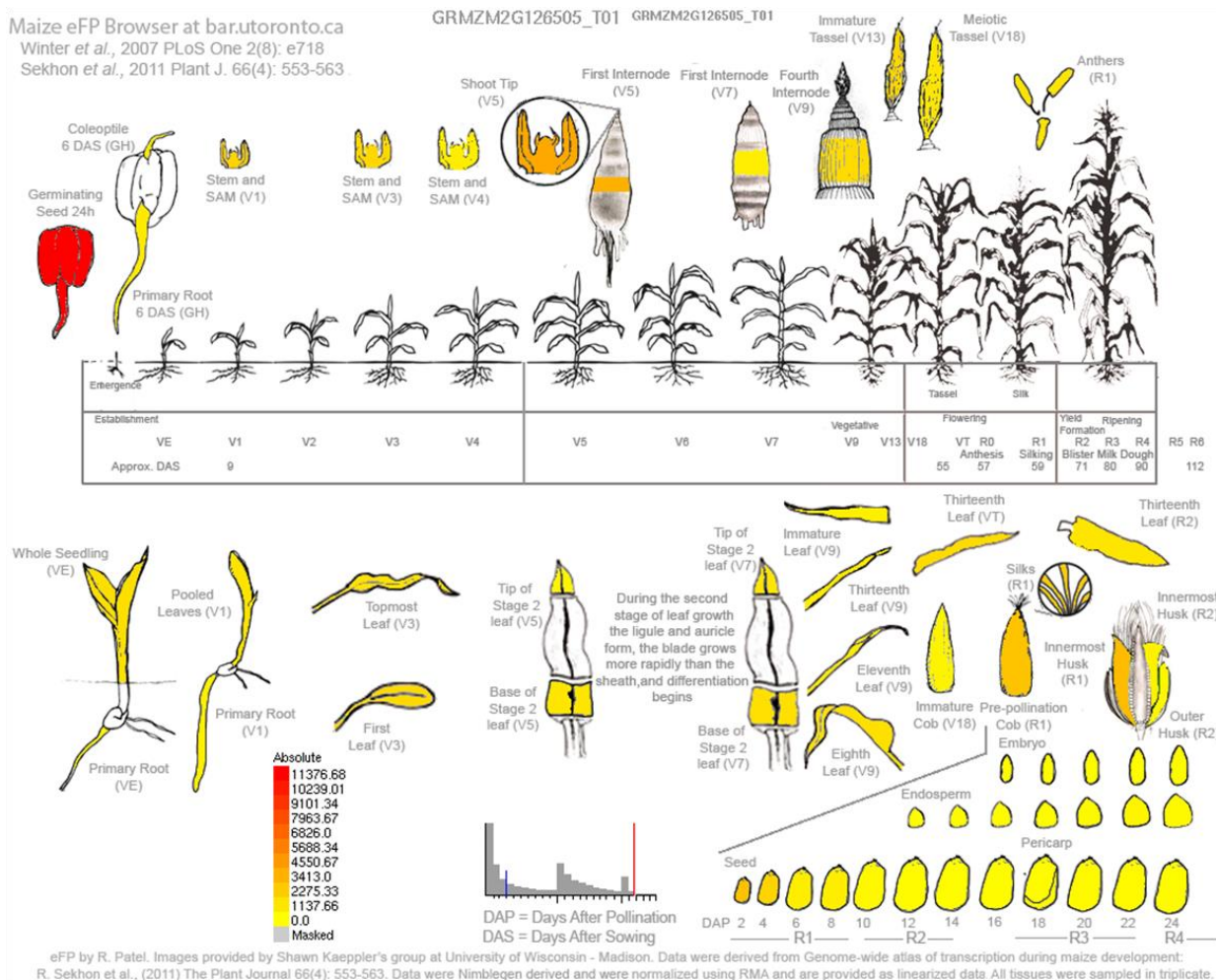


Abbildung 27: Expression eines nahegelegenen Gens am Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3440

Analysen der umgebenden Region des T-DNA Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3440 zeigte im Abstand von 1250 bp hinter der T-DNA ein Gen, das mit einem Cytochrom P450 in Verbindung gebracht wird. Für die in dieser Arbeit relevanten Zeitpunkte in der Pflanzenentwicklung konnte während der Keimung eine extrem starke Expression festgestellt werden. Für die verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung konnte nur eine mäßige Expression gefunden werden, während in unreifen Embryonen keine Expression gezeigt werden konnte. Die in der Abbildung dargestellte Verteilung der Expressionsstärke dieser Gens in den verschiedenen Geweben während der Entwicklung der Maispflanze wurden durch Mikroarray Analysen von ESTs definiert (Sekhon et al. 2011) und dargestellt mit Hilfe des eFP Browsers (Winter et al. 2007). Eine schwache Expression ist durch eine gelbe Farbe definiert. Mit Zunahme der Expressionsstärke nimmt der Rotanteil in der Färbung kontinuierlich zu, bis eine vollständig rote Färbung des Gewebes eine extrem starke Expression des entsprechenden Gens darstellt.

Gene ID: GRMZM2G126505 ; PFAM ID: PF00067: Cytochrome P450

4.6.2 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711

Die Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711 ergab, außer einer Mikrosatelliteninsertion von 162 bp in der genomischen Sequenz, im Vergleich zum Genom von B73, keine besonderen Auffälligkeiten. Auf der rechten Seite verblieben 2 bp der Right Border Sequenz, während auf der linken Seite noch 18 bp der Left Border Sequenz zu finden waren. Auch hier war nach der Integration eine Primerbindestelle degeneriert, so dass ein direkter Nachweis der erfolgreichen finalen Rekombination (siehe 3.5.1) unmöglich war. Der Integrationsort des Konstrukts befindet sich nur 200 bp vor einem Transkript (GRMZM2G124550), welches eine Protein Tyrosin Kinase (PFAM ID: PF07714) kodiert. Analysen von R.S. Sekhon und Mitarbeiter (2011) konnten durch Mikroarrayanalysen in diversen Geweben eine deutliche Aktivität dieses Gens nachweisen (Abb.28). Insbesondere die Aktivität während der Keimung und in den Geweben der Gametenbildung zusammen mit der sehr guten Rekombinationseffizienz der Linie lassen auf einen positiven Positionseffekt schließen, sowohl bei der Aktivierung der Konstrukte im Keimling, als auch bei den finalen Exzisionen im Pollen und in den Embryonen.

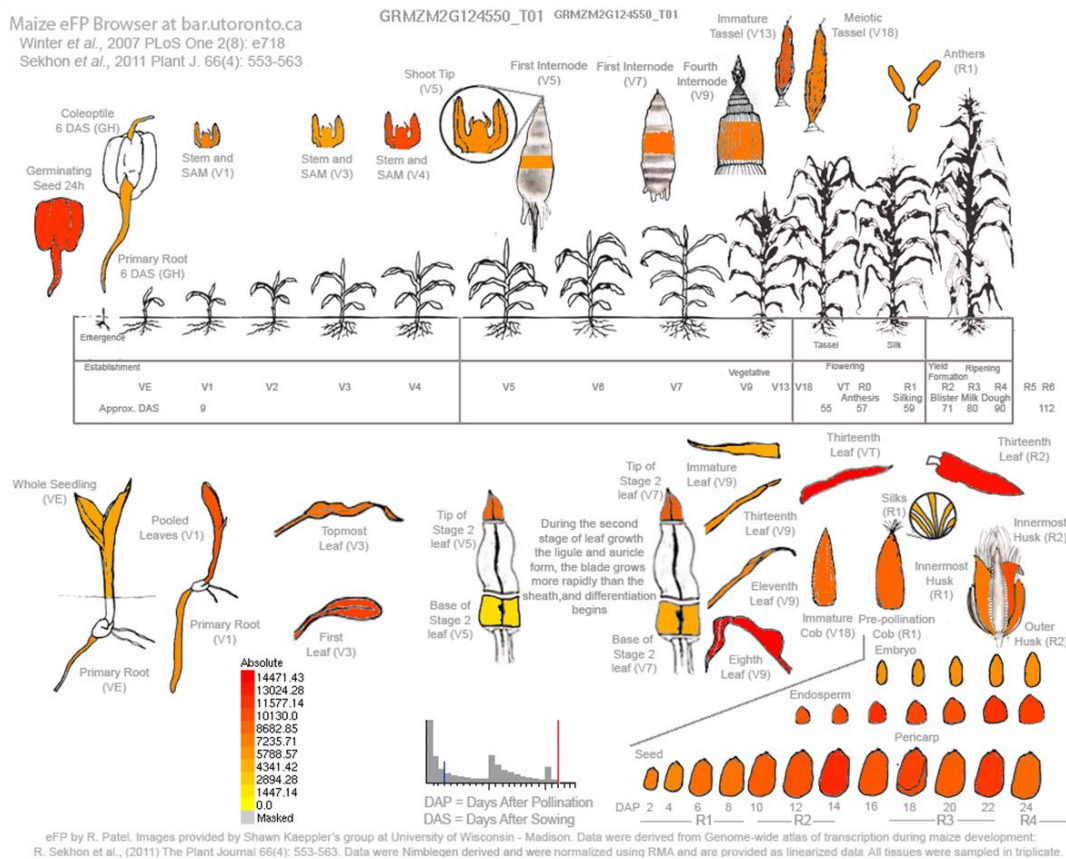


Abbildung 28: Expression eines nahegelegenen Gens am Integrationsort der Linie pGermlineEx2-4711

Analysen der umgebenden Region des T-DNA Integrationsortes der Linie pGermlineEx2-4711 zeigte 193 bp hinter der T-DNA ein Gen, das mit einer Protein Tyrosin Kinase in Verbindung gebracht wird. Für die in dieser Arbeit relevanten Zeitpunkte in der Pflanzenentwicklung konnte während der Keimung eine extrem starke Expression festgestellt werden. Für die verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung konnte eine starke Expression gefunden werden, während in unreifen Embryonen eine mittlere Expressionsstärke gezeigt werden konnte. Die in der Abbildung dargestellte Verteilung der Expressionsstärke dieser Gens in den verschiedenen Geweben während der Entwicklung der Maispflanze wurden durch Mikroarray Analysen von ESTs definiert (Sekhon *et al.* 2011) und dargestellt mit Hilfe des eFP Browsers (Winter *et al.* 2007). Eine schwache Expression ist durch eine gelbe Farbe definiert. Mit Zunahme der Expressionsstärke nimmt der Rotanteil in der Färbung kontinuierlich zu, bis eine vollständig rote Färbung des Gewebes eine extrem starke Expression des entsprechenden Gens darstellt.

Gene ID: GRMZM2G124550 ; PFAM ID: PF00069: Protein kinase domain

4.6.3 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlinEx1-3735

Die inverse PCR lieferte bei dieser Linie statt des erwarteten Integrationsortes zwei unterschiedliche Integrationsorte.

Die Integration auf Chromosom 4 zeigte neben der normalen Integration auf der Left Border Seite, eine deutliche Veränderung auf der rechten Seite des Konstrukts. Nach der *loxP* Sequenz konnte die Integration von einer 38 bp großen Sequenz nachgewiesen werden, deren Herkunft nicht ermittelt werden konnte. Auf diese Sequenz folgt in inverser Orientierung das restliche Fragment der Right Border Sequenz. Die zweite Integration, welche vermutlich auf Chromosom 3 liegt, konnte nur über die rechte Seite des Integrates gezeigt werden. Versuche die linke Seite des Konstrukts mittels Amplifikation zu analysieren scheiterten. Als Grund hierfür könnten größere Umlagerungen in der genomischen DNA vermutet werden, entweder durch die Integration des Konstrukts (Meza et al. 2002) oder durch die linienabhängige Sequenzunterschiede zu der Referenzlinie B73. Während die erfolgreiche Exzision des Konstrukts im Kontext der genomischen DNA für zwei Nachkommen (A188 x pGermlinEx1-3735 HS2 #4 und #10) auf dem Chromosom 4 gezeigt wurde, konnte die Exzision auf dem Chromosom 3 nicht im Zusammenhang der umliegenden genomischen DNA gezeigt werden. Der direkte PCR Nachweis (siehe 3.5.1; Abb.18), welcher aber aufgrund der Inversion des Right Border Bereichs für Exzisionen auf dem Chromosom 4 nicht möglich ist, konnte aber die Exzision in den Nachkommen A188 x pGermlinEx1-3735 HS2 #3, #4, #7, #8 und #11 belegen. Dieses deutet auf eine erfolgreiche Exzision und ein vollständiges Integrat auf dem Chromosom 3 hin, auch wenn keine genauen Analysen des Integrationsortes auf der linken Seite der T-DNA möglich waren.

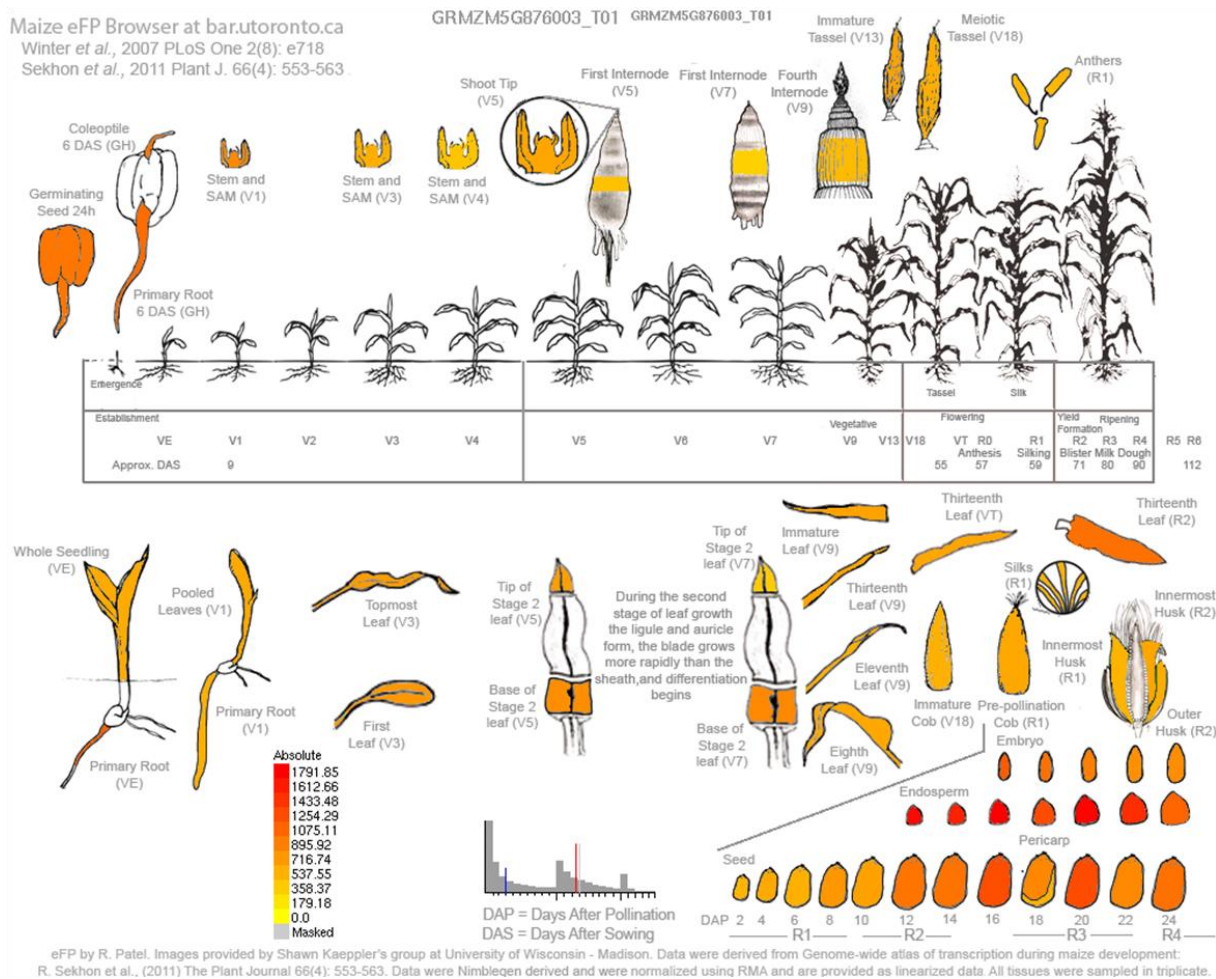


Abbildung 29: Expression eines nahegelegenen Gens am Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3735 auf Chromosom 4

Die Analysen des Integrationsortes auf Chromosom 4 ergaben die Integration der T-DNA in ein 12,8 kb großes Intron einer hypothetischen Methyltransferase. Für die in dieser Arbeit relevanten Zeitpunkte in der Pflanzenentwicklung konnte während der Keimung eine starke Expression festgestellt werden. Für die verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung konnte eine mittelmäßige Expression gefunden werden, während in unreifen Embryonen eine starke Expressionsstärke gezeigt werden konnte. Die in der Abbildung dargestellte Verteilung der Expressionsstärke dieser Gens in den verschiedenen Geweben während der Entwicklung der Maispflanze wurden durch Mikroarray Analysen von ESTs definiert (Sekhon et al. 2011) und dargestellt mit Hilfe des eFP Browsers (Winter et al. 2007). Eine schwache Expression ist durch eine gelbe Farbe definiert. Mit Zunahme der Expressionsstärke nimmt der Rotanteil in der Färbung kontinuierlich zu, bis eine vollständig rote Färbung des Gewebes eine extrem starke Expression des entsprechenden Gens darstellt.

Gene ID: GRMZM5G876003; PFAM ID: PF05148: Hypothetical methyltransferase

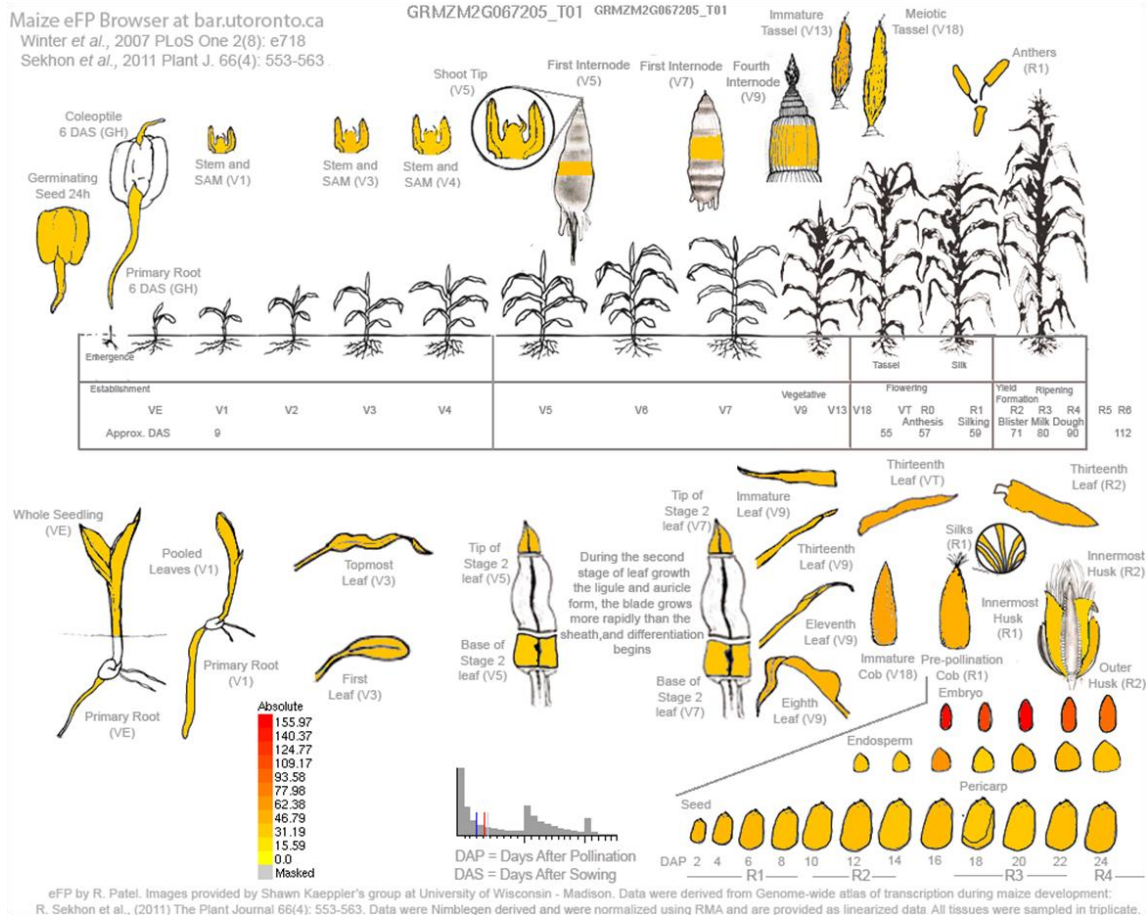


Abbildung 30: Expression eines nahegelegenen Gens am Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3735 auf Chromosom 3

Im Abstand von etwa 1450 bp vor dem zweiten Integrationsort der T-DNA der Linie pGermlineEx1-3735 liegt ein gen mit einer bislang unbekanntenen Funktion. Vergleiche zeigen eine starke Homologie zu C2H2-Zinkfinger Proteinen in Arabidopsis und Reis. Trotz der unbekanntenen Funktion konnten die Expressionsanalysen eine während der Keimung und der Pollenentwicklung eine mittlere Expressionsstärke zeigen. Im unreifen Embryo zeigte sich eine starke Expression. Die in der Abbildung dargestellte Verteilung der Expressionsstärke dieses Gens in den verschiedenen Geweben während der Entwicklung der Maispflanze wurden durch Mikroarray Analysen von ESTs definiert (Sekhon *et al.* 2011) und dargestellt mit Hilfe des eFP Browsers (Winter *et al.* 2007). Eine schwache Expression ist durch eine gelbe Farbe definiert. Mit Zunahme der Expressionsstärke nimmt der Rotanteil in der Färbung kontinuierlich zu, bis eine vollständig rote Färbung des Gewebes eine extrem starke Expression des entsprechenden Gens darstellt.

Gene ID: GRMZM2G067205; PFAM ID: AT1G68480.1 (JAG): C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein *Arabidopsis thaliana*

4.6.4 Analyse des Integrationsortes der Linie pGermlineEx1-3715

Hier konnte nur die Integration der rechten Seite des Konstrukts auf dem Chromosom 4 nachgewiesen werden. Auffällig hierbei war die Duplikation eines 100 bp Fragments aus dem pActin Promotor, welches als filler DNA neben dem Right Border Rest eingesetzt worden war. Amplifikationen der linken Seite des Konstrukts scheiterten. Der direkte Nachweis der finalen Exzision (siehe 3.5.1) in einem Nachkommen zeigte auch hier die erfolgreiche Entfernung der T-DNA in der nächsten Generation. Dieses lässt auf eine vollständige Integration des Konstrukts schließen, so dass die erfolglosen Bemühungen, die linke Seite der T-DNA im Genom aufzuzeigen, anscheinend an der genomischen Sequenz und nicht an dem Konstrukt lagen. Der postulierte Integrationsort liegt nur etwa 900 bp aufwärts eines stark exprimierten Gens (GRMZM2G032475), das eine anscheinend eine Nukleotidyltransferase Domäne (PFAM ID 01909) codiert. Die Mikroarray Analysen von Sekhon und Mitarbeitern (2011) zeigten auch hier eine überdurchschnittliche Expression des entsprechenden Gens von den unreifen Tasseln bis hin zu den reifen Antheren, aber auch den sich entwickelnden Kolben und Kornanlagen (Abb.31). Auch hier könnte von einem positiven Einfluss des Integrationsortes auf die Effektivität des Konstrukts geschlossen werden, da weder einer der insgesamt 134 Nachkommen der Pollenauskreuzung noch einer der 102 Nachkommen aus dem mit A188 bestäubten Kolben transgene Eigenschaften zeigte.

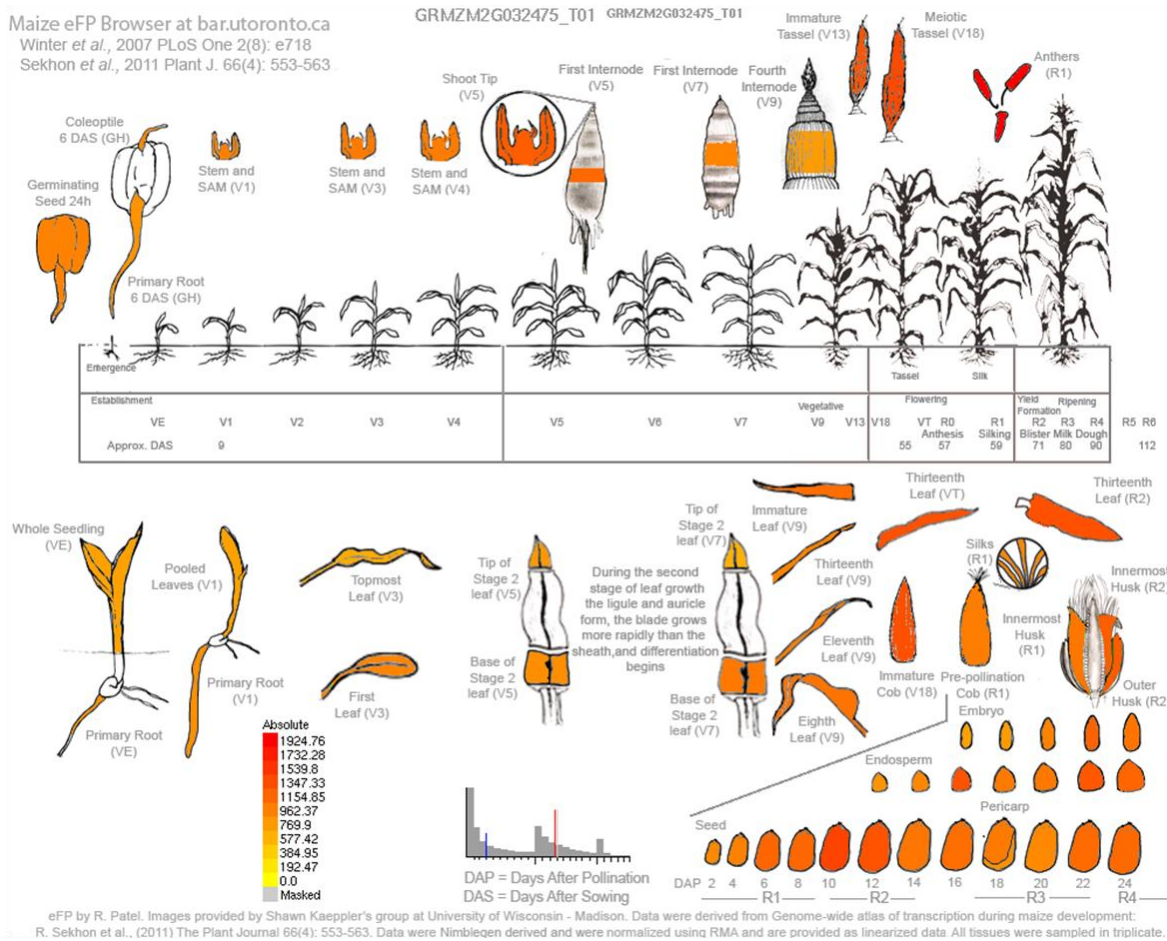


Abbildung 31: Expression eines nahegelegenen Gens am Integrationsort der Linie pGermlineEx1-3715 auf Chromosom 4

Etwa 900 bp hinter dem Integrationsort der T-DNA der Linie pGermlineEx1-3715 konnte das Gen einer Nukleotidyltransferase lokalisiert werden. Für die in dieser Arbeit relevanten Zeitpunkte in der Pflanzenentwicklung konnte während der Keimung eine starke Expression festgestellt werden. Für die verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung konnte eine sehr starke Expression gefunden werden, während in unreifen Embryonen eine starke Expressionsstärke gezeigt werden konnte. Die in der Abbildung dargestellte Verteilung der Expressionsstärke dieses Gens in den verschiedenen Geweben während der Entwicklung der Maispflanze wurden durch Mikroarray Analysen von ESTs definiert (Sekhon et al. 2011) und dargestellt mit Hilfe des eFP Browsers (Winter et al. 2007). Eine schwache Expression ist durch eine gelbe Farbe definiert. Mit Zunahme der Expressionsstärke nimmt der Rotanteil in der Färbung kontinuierlich zu, bis eine vollständig rote Färbung des Gewebes eine extrem starke Expression des entsprechenden Gens darstellt.

Gene ID: GRMZM2G032475; PFAM ID: PF01909: Nucleotidyltransferase domain

4.7 Fazit und Ausblick

Der Einsatz von Rekombinasen zur Exzision von Markergenen oder Konstruktbestandteilen konnte schon diverse Male in verschiedensten relevanten Pflanzen (Pappel: Fladung et al. 2010; Mais: Kerbach et al. 2005; Kartoffel: Cuellar et al. 2006) erfolgreich umgesetzt werden. Hierbei kamen entweder induzierbare (Herzog et al. 2012, Hoff et al. 2001, Sugita et al. 2000, Wang et al. 2005, Yuan et al. 2004) oder gewebespezifische Promotoren (Verweire et al. 2007; Luo et al. 2007; Mlynárová et al. 2006) zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde das erste Mal ein System erprobt, dass die Möglichkeiten der induzierbaren Aktivierung mit der gewebespezifischen Exzision kombinierte und dabei sämtliche codierende und regulierende Sequenzen entfernt. Durch die induzierbare Aktivierung der Konstrukte mit Hilfe des ersten Rekombinasesystems ist es möglich die transformierten Pflanzen in der Züchtung und der Saatgutherstellung einzusetzen.

Der Einsatz einer gewebespezifischen Expression der zweiten Rekombinase ermöglicht es die transgenen Eigenschaften in den Pflanzen, bis zu einem durch die Wahl des Promotors bestimmten Zeitpunkt, aufrecht zu erhalten. Durch die Exzision sämtlicher codierender und regulierender Sequenzen aus dem pflanzlichen Genom wird die Ausbreitung von transgenen Eigenschaften in die Umwelt erfolgreich unterbunden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist transgene Pflanzen zu erstellen und zu züchten, die ausschließlich Nachkommen ohne transgenen Phänotyp erzeugen. Je nach gewähltem gewebespezifischem Promotor kam es weder über den Pollenweg noch durch die Körner der transgenen Pflanzen zu einer unkontrollierten Ausbreitung des transgenen Phänotyps in den Nachkommen. Trotz der Wiederherstellung des natürlichen Phänotyps der Pflanzen verbleiben dennoch residuale transgene Sequenzen im Genom, darunter Vektorsequenzen und eine Erkennungssequenz der Rekombinase. Daher sind die Nachkommen der transgenen Pflanzen natürlich weiterhin rechtlich als transgene Pflanzen zu betrachten. Aufgrund der juristischen Lage in der Europäischen Union (Richtlinie 2001/18/EG) ist die Definition eines gentechnisch veränderten Organismus nicht an die Eigenschaften oder Sequenzen die übertragen worden sind gekoppelt, sondern an die angewandte Methode der Sequenzübertragung und betrifft damit auch automatisch alle Nachkommen derartiger

Pflanzen, selbst wenn sie durch Segregation nachweislich keine Veränderungen im Erbgut mehr aufweisen.

Durch einige geringfügige Veränderungen im Konstrukt, zum Beispiel der Einsatz eines synthetischen oder durch gängige Spritzmittel aktivierbaren Promotors (ZmGST-II-27 (Bridges et al. 1993) oder ZmIn5-2 (Yuan et al. 2004) beide aus Mais) könnte die Aktivierung der Konstrukte in einem landwirtschaftlichen Maßstab durchgeführt werden. Der Einsatz der FLPe Rekombinase (Buchholz et al. 1998) oder einer kodonoptimierten Cre Rekombinase könnte zusätzlich zu einer weiteren Steigerung der Zuverlässigkeit der Rekombinasen führen. Darüber hinaus könnten auch Mutationen in den Erkennungssequenzen der Rekombinasen die Exzisionsraten weiter erhöhen (Langer et al. 2002, Lee und Saitu, 1998). Der Einsatz derartiger Konstrukte in der Landwirtschaft könnte einen wichtigen Beitrag in der Eindämmung von transgenen Kontaminationen darstellen und zu der Biosicherheit von transgenen Pflanzen beitragen.

5. Literaturverzeichnis

Akbudak MA und Srivastava V (2011). Improved FLP Recombinase, FLPe, Efficiently Removes Marker Gene from Transgene Locus Developed by Cre-lox Mediated Site-Specific Gene Integration in Rice. *Molecular Biotechnology* 49: 82-89

Araki H, Jearnpiparkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Ushio K, Muta T und Oshima Y (1985). Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *Journal of Molecular Biology* 182: 191-203

Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SVL, Pierson LS, Sternberg N und Leong JM (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *The EMBO Journal* 5 (2): 433-440,

Armstrong C, Green CE und Phillips RL (1991). Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genetics Coop Newsletter* 65: 92-93

Bannert M and Stamp P (2007). Cross-pollination of maize at long distance. *European Journal of Agronomy* 27: 44-51

Bannert M, Vogler A und Stamp P (2008). Short-distance cross-pollination of maize in a small-field landscape as monitored by grain color markers. *European Journal of Agronomy* 29: 29-32

Becker D, Wieser H, Koehler P, Folk, A Mühling KH und Zörb C (2012). Protein composition and techno-functional properties of transgenic wheat with reduced α -gliadin content obtained by RNA interference. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 85: 23-33

Beckie HJ und Hall LM (2008). Simple to complex: Modelling crop pollen-mediated gene flow. *Plant Science* 175: 615–628

Beilmann A, Pfitzner AJP, Goodman HM und Pfitzner UM (1991). Functional analysis of the pathogenesis-related 1a protein gene minimal promoter region. *European Journal of Biochemistry* 196: 415-421

Belostotsky DA und Meagher RB (1996). A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly (A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast. *Plant Cell* 8: 1261-1275

Bridges IG, Bright SWJ, Greenland AJ, Holt DC, Jepson I und Schuch W (1993). Plant-driven enzyme and DNA sequences, and the uses thereof. Patent No. WO 9301294

Brinkmann U, Mattes RE und Buckel P (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product *Gene* 85: 109-114

Broach JR und Hicks JB (1980). Replication and Recombination Functions Associated with the Yeast Plasmid, 2 μ Circle. *Cell* 21: 501-508

Brookes G und Barfoot P (2010). Global Impact of Biotech Crops: Environmental Effects, 1996-2008. *AgBioForum* 13(1): 76-94

Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F und Stewart AF (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Research* 24 (21): 4256–4262

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-378

Charles Darwin (1868). *The Variations of Animals and Plants under Domestication*.
William Clowes and Sons

Chen XJ, Saliola M, Falcone C, Bianchi MM und Fukuhara H (1986). Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilum*. *Nucleic Acids Research* 14 (11): 4471-4481

Chen Y und Rice PA (2003). NEW INSIGHT INTO SITE-SPECIFIC RECOMBINATION FROM FLP RECOMBINASE-DNA STRUCTURES.

Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 32: 135–59

Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP und Nester EW (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 Bacteriophage DNA Not Detected in Crown Gall Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71(9): 3672-3676

Chong-Pérez B, Kosky RG, Reyes M, Rojas L, Ocaña B, Tejeda M, Pérez B und Angenon G (2012). Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Biotechnology* 159(4): 265–273

Christensen AH, Sharrock RA und Quail PH (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu KC, Yen KC, Chu CY und Bi FY (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experimentation on the nitrogen source. *Scientia Sinica* 13: 659-668

Cleveland DA, Soleri D, Aragón Cuevas F, Crossa J und Gepts P (2005). Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environmental Biosafety Research* 4: 197-208

Coruzzi G, Broglie R, Edwards C und Chua NH (1984). Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO Journal* 3(8): 1671-1679

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, van Rie J, Lereclus D, Baum J und Dean DH (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 807-813

Crone D, Rueda J, Martin KL, Hamilton DA und Mascarenhas JP (2001). The differential expression of a heat shock promoter in floral and reproductive tissues. *Plant, Cell and Environment* 24: 869-874

Cuellar W, Gaudin A, Solórzano D, Casas A, Nõpo L, Chudalayandi P, Medrano G, Kreuze J und Ghislain M (2006). Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. *Plant Molecular Biology* 62: 71-82

Czarnecka E, Gurley WB, Nagao RT, Mosquere LA und Key JL (1985). DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 3726-3730,

DeRocher AE, Helm KW, Lauzon LM und Vierling E (1991). Expression of a Conserved Family of Cytoplasmic Low Molecular Weight Heat Shock Proteins during Heat Stress and Recovery. *Plant Physiology* 96: 1038-1047

Edwards JW, Walker EL und Coruzzi GM (1989). Developmentally Regulated Expression of the Gene Family for Cytosolic Glutamine Synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 91: 702-708

Ellstrand NC (2003). Going to “Great Lengths” to Prevent the Escape of Genes That Produce Specialty Chemicals. *Plant Physiology* 132: 1770-1774

Fladung M, Schenk TMH, Polak O und Becker D (2010). Elimination of marker genes and targeted integration via FLP/FRT recombination system from yeast in hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.). *Tree Genetics & Genomes* 6: 205-217

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC (1997). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11

Fladung M (1999). Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Molecular and General Genetics* 260: 574-581

Gatz C (1997). CHEMICAL CONTROL OF GENE EXPRESSION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 89-108

Gheysen G, Villarroel R und Van Montagu M (1991). Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes & Development* 5: 287-297

Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM und Barro F (2010). Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107(39): 17023-12028

Gillis J (2003). U.S. will subsidize cleanup of altered corn. *Washington Post*, Wednesday, March 26, 2003, p E01

Green CE und Phillips RL (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science* 15: 417-421

Griswold KE, Mahmood NA, Iverson BL und Georgiou G (2003). Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Expression and Purification* 27(1): 134-142

Gustafsson C, Govindarajan S und Minshull J (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* 22(7): 346-353

Hallet B und Sherratt DJ (1997). Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanism to a variety of genetic rearrangements.

FEMS Microbiology Reviews 21: 157-178

Hartley JL und Donelson JE (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid.

Nature 286: 860-864

He Y, Ning T, Xie T, Qiu Q, Zhang L, Sun Y, Jiang D, Fu K, Yin F, Zhang W, Shen L, Wang H, Li J, Lin Q, Sun Y, Li H, Zhu Y und Yang D (2011). Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 108(47):19078-19083

Herzog K, Flachowsky H, Deising HB und Hanke MV (2012). Heat-shock-mediated elimination of the nptII marker gene in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh.).

Gene 498 (1): 41-49

Hoff T, Schnorr KM und Mundy J (2001). A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. Plant Molecular Biology 45: 41-49

Hoffman GR (1980). GENETIC EFFECTS OF DIMETHYL SULFATE, DIETHYL SULFATE, AND RELATED COMPOUNDS. Mutation Research 75: 63-129

Höfgen R und Willmitzer L (1988). Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Research 16 (20): 9877

Höfte H und Whiteley HR (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 53(2): 242

Hossain F, Pray CE, Lu Y, Huang J, Fan C und Hu R (2005). Genetically Modified Cotton and Farmers' Health in China. International Journal of Occupational and Environmental Health 10: 296-303

Hu Q, Kononowicz-Hodges H, Nelson-Vasilchik K, Viola D, Zeng P, Liu H, Kausch AP, Chandlee JM, Hodges TK und Luo H (2008). FLP recombinase-mediated site-specific recombination in rice. Plant Biotechnology Journal 6: 176-188

Huang J, Hu R, Rozelle S, Qiao F und Pray CE (2005). Transgenic varieties and productivity of smallholder cotton farmers in China.

The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics 46 (3): 367-387

Hüsken A, Prescher S und Schiemann J (2010). Evaluating biological containment strategies for pollen-mediated gene flow. Environmental Biosafety Research 9: 67–73

Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke MA und Matzke AJM (1997). Molecular and Cytogenetic Analyses of Stably and Unstably Expresses Transgene Loci in Tobacco. The Plant Cell 9: 1251-1264

Inoue H, Nojima H und Okayama H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96: 23-28

James C (2012). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012.

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, ISAAA Brief 44

Jefferson RA, Kavanagh TA und Bevan MW (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.

The EMBO Journal 6(13): 3901-3907

Kane JF (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology 6: 494-500

Kerbach S, Lorz H und Becker D (2005). Site-specific recombination in Zea mays.

Theoretical and Applied Genetics 11: 1608-1616

Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Redei GP und Schell F (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 86: 8467-8471

Kondrák M, van der Meer IM und Bánfalvi Z (2006). Generation of Marker- and Backbone-Free Transgenic Potatoes by Site-Specific Recombination and a Bi-Functional Marker Gene in a Non-Regular One-Border Agrobacterium Transformation Vector. *Transgenic Research* 5: 729-737

Kopertekh L, Jüttner G und Schiemann J (2004). PVX-Cre-mediated marker gene elimination from transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 55: 491-500

Kopertekh L und Schiemann J (2012). Elimination of Transgenic Sequences in Plants by Cre Gene Expression, *Transgenic Plants - Advances and Limitations*, PhD. InTech: 449-469; ISBN: 978-953-51-0181-9

Kumar S und Fladung M (2000). Transgene repeats in aspen: molecular characteristics suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Molecular and General Genetics* 264: 20-28

Kumar S und Fladung M (2002). Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *The Plant Journal* 31(4): 543-551

Langer SJ, Ghafoori AP, Byrd M und Leinwand L (2002). A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites. *Nucleic Acids Research* 30(14): 3067-3077

Langhof M, Hommel B, Hüsken A, Njontie C, Schiemann J, Wehling P, Wilhelm R und Rühl G (2010). Coexistence in Maize: Isolation Distance in Dependence on Conventional Maize Field Depth and Separate Edge Harvest. *Crop Science* 50: 1496-1508

Lee G und Saito I (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65

Lu BR (2003). Transgene containment by molecular means - is it possible and cost effective? *Environmental Biosafety Research* 2: 3-8

Lu BR (2008). Transgene Escape from GM Crops and Potential Biosafety Consequences: An Environmental Perspective. *Collection of Biosafety Reviews* 4: 66-141

Luo K, Duan H, Zhao D, Zheng X, Deng W, Chen Y, Stewart Jr CN, McAvoy R, Jiang X, Wu Y, He A, Pei Y und Li Y (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 Biotechnology Journal* 5: 263-274

Lyznik LA, Hirayama L, Rao KV, Abad A und Hodges TK (1995). Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *The Plant Journal* 8(2): 177-186

Ma BG, Duan XY, Na C, Niu JX, Zhang H und Pan L (2008). Salicylic-Acid-Induced Self-excision of the Marker Gene nptII from Transgenic Tomato Using the Cre-loxP System. *Plant Molecular Biology Reporter* 26: 199-212

Ma BL, Subedi KD und Reid LM (2004). Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids. *Crop Science* 44: 1273-1282

Ma BG, Duan XY, Niu JX, Ma C, Hao QN, Zhang LX und Zhang HP (2009). Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker. *Biotechnology Letters* 31: 163-169

Matus-Cádiz MA, Hucl P und Dupuis B (2007). Pollen-Mediated Gene Flow in Wheat at the Commercial Scale. *Crop Science* 47: 573-581

Matzke AJM und Matzke MA (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 142-148

Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B und Koncz C (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO Journal* 10 (3): 697-704

Mba C, Afza R, Bado S und Jain SM (2010). Induced Mutagenesis in Plants Using Physical and Chemical Agents. *Plant Cell Culture: Essential Methods*, Chapter 7: 111-130

McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ und Christou P (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine Max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6: 923-926

McElroy D, Blowers AD, Jenes B und Wu R (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* 231: 150-160

Meza TJ, Stangeland B, Mercy IS, Skårn M, Nymoen DA, Berg A, Butenko MA, Håkelién AM, Haslekås C, Meza-Zepeda LA und Aalen RB (2002). Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Research* 30 (20): 4556-4566

Miller J (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Mlynárová L, Conner AJ und Nap JP (2006). Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. *Plant Biotechnology Journal* 4: 445-452

Moose SP und Mumm RH (2008). Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology* 147: 969-977

Murashige T und Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Nagaya S, Kato K, Ninomiya Y, Horie R, Sekine M, Yoshida K und Shinmyo A (2005). Expression of Randomly Integrated Single Complete Copy Transgenes Does not Vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46 (3): 438-444

Naqvi S, Zhu C, Farre G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J, Conesa DP, Gaspar Ros G, Sandmann G, Capell T und Christou P (2009). Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106 (19): 7762-7767

Nern A, Pfeiffer BD, Svoboda K und Rubin GM (2011). Multiple new site-specific recombinases for use in manipulating animal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108 (34): 14198-14203

Novak FJ und Brunner H (1992). Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bulletin* 4: 25-33

Ochman H, Gerber AS und Hartl D (1988). Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics* 120: 621-623

Oldenhof MT, de Groot PFM, Visser JH, Schrauwen JAM und Wullems GJ (1996). Isolation and characterization of a microspore-specific gene from tobacco. *Plant Molecular Biology* 31: 213-225

Ortiz-García S, Ezcurra E, Schoel B, Acevedo F, Soberón J und Snow AA (2005). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102 (35): 12338-12343

Pallotta MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB und Barker SJ (2000). RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theoretically Applied Genetics* 101: 1100-1108

Patterson SE (2001). Cutting Loose. Abscission and Dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 494-500

Peach C und Velten J (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters.

Plant Molecular Biology 17: 49-60

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL und Fischhoff DA (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes.

PNAS 88: 3324-3328

Qaim M und Zilberman D (2003). Yield Effects of Genetically Modified Crops in Developing Countries. Science 299: 900-902

Quist D und Chapela ICH (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature 414: 541-543

Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB und Roush RT (2002). Pollen-Mediated Movement of Herbicide Resistance Between Commercial Canola Fields.

Science 296: 2386-2388

Ringrose L, Lounnas V, Ehrlich L, Buchholz F, Wade R und Stewart AF (1998). Comparative Kinetic Analysis of FLP and Cre Recombinases: Mathematical Models for DNA Binding and Recombination. Journal of Molecular Biology 284: 363-384

Saedler H und Schuchert W (2001). Biotechnologie in der Pflanzenproduktion
Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989). Molecular Cloning a Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Section 9.31.

Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KT, Mendes O und Rouwendal GJ (2004). Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene.

Plant Biotechnology Journal 2: 233-240

Schreiber DN, Bantin J und Dresselhaus T (2004). The MADS Box Transcription Factor ZmMADS2 Is Required for Anther and Pollen Maturation in Maize and Accumulates in Apoptotic Bodies during Anther Dehiscence¹. *Plant Physiology* 134: 1069-1079

Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Buell CR, de Leon N und, Kaepler SM (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development.

The Plant Journal 66: 553-563

Shindo T, Takahashi T, Nihira T, Yamada Y, Kato K und Shinmyo A (2006). Streptomyces-Derived Induction System for Gene Expression in Cultured Plant Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102 (6): 552-559

Smith MCM und Thrope HM (2002). Diversity in the serine recombinases. *Molecular Microbiology* 44 (2): 299-307

Snow A (2009). Unwanted Transgenes Re-Discovered in Oaxacan Maize.

Molecular Ecology 18: 569-571

Song H und Niederweis M (2007). Functional expression of the Flp recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene* 399 (2): 112-119

Stark WM, Boocock MR und Sherratt DJ (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends in Genetics* 8 (12): 432-439

Stenström CM, Holmgren E und Isaksson LA (2001). Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation. *Gene* 273: 259-265

Sternberg N und Hamilton D (1981). Bacteriophage P1 Site-specific Recombination I. Recombination Between loxP Sites. *Journal of Molecular Biology* 150: 467-486

Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E und Ebinuma H (2000). A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *The Plant Journal* 22(5): 461-469

Suzuki E und Nakayama M (2011). VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering. *Nucleic Acids Research* 39 (8): e49

TAB-Arbeitsberichtes Nr. 104 (2006). Grüne Gentechnik - transgene Pflanzen der 2. und 3. Generation

The European Union Framework 6 Pharma–Planta Consor (2005). Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO reports*

Toh-e A und Utatsu I (1985). Physical and functional structure of a yeast plasmid, pSB3, isolated from *Zygosaccharomyces bisporus*. *Nucleic Acids Research* 13 (12): 4267-4283

Twell D, Yanaguchi J und McCormick S (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109: 705-713

Tyshko NV, Aksyuk IN und Tutelyan VA (2007). Safety assessment of genetically modified organisms of plant origin in the Russian Federation. *Biotechnology Journal* 2: 826-832

Utatsu I, Sakamoto S, Imura T und Toh-e A (1987). Yeast Plasmids Resembling 2 micron DNA: Regional Similarities and Diversities at the Molecular Level. *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5537-5545

Vanncanneyt G, Schmidt R, O'Conner-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. *Molecular and General Genetics* 220: 245-250

Verweire D, Verleyen K, De Buck S, Claeys M, und Angenon G (2007). Marker-Free Transgenic Plants through Genetically Programmed Auto-Excision. *Plant Physiology* 145: 1220-1231

Wang Y, Chen B, Hu Y, Li J, Lin Z (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system.

Transgenic Research 14: 605-614

Wegier A, Piñeyro-Nelson A, Alarcón J, Gálvez-Mariscal A, Alvarez-Buylla ER und Piñero D. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Molecular Ecology* 20: 4182-4194

Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H und Getz C (1994). A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants.

The Plant Journal 5 (4): 559-569

Williams S, Friedrich L, Dincher S, Carozzi N, Kessmann H, Ward E und Ryals J (1992). Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin expression in transgenic plants *BioTechnology* 10: 540-543

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV und Provart N (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2(8): e718

Woo HJ, Cho HS, Lim SH, Shin KS, Lee SM, Lee KJ, Kim DH und Cho YG (2009). Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/FRT site-specific recombination system. *Transgenic Research* 18(3): 455-465

Xu H, Davies SP, Kwan BYH, O'Brien AP, Singh M und Kroy RB (1993). Haploid and diploid expression of *Brassica campestris* anther-specific gene promoter in *Arabidopsis* and tobacco. *Molecular and General Genetics* 239: 58-65

Yarchuck O, Jaques N, Guillerez J und Dreyfus M (1992). Interdependence of Translation, Transcription and mRNA Degradation in the lacZ Gene. *Journal of Molecular Biology* 226: 581-596

Yuan Y, Liu YJ und Wang T (2004). A New Cre/lox System for Deletion of Selectable Marker Gene. *Acta Botanica Sinica* 46 (7): 862-866

Zeder M (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105 (33): 11597-11604

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. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1157-1168

Zhang Y, Li H, Ouyang B, Lu Y und Ye Z (2006). Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnology Letters* 28: 1247-1253

Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J und Muzyczka N (1996). A "Humanized" Green Fluorescent Protein cDNA Adapted for High-Level Expression in Mammalian Cells. *Journal of Virology* 70(7): 4646-4654

Zuo J, Niu QW, Møller SG und Chua NH (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 19 (2): 157-161

Internetressourcen:

www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/starlink_corn.htm

www.biosicherheit.de/aktuell/150.tilling-alternative-gentechnik.html

www.biosicherheit.de

www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp

www.kazusa.or.jp/codon/

www.maizegdb.org

www.maizesequenze.org

Abkürzungsverzeichnis

(CaMV)35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotorsequenz
Abb.	Abbildung
bar	Gen der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Chr	Chromosom
Cre	Causes Recombination, Rekombinase der Bakteriophage P1
CSPD	Disodium 3-(4-meth-oxyspiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan)-4-yl) phenyl Phosphat
Dig	Digoxigenin-11-dUTP
dig-dUTP	Digoxigenin-11-Desoxy-Uridintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA Nuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E9	Terminatorsequenz der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase aus <i>Pisum sativum</i>
et al.	und Mitarbeiter
FLP	Flipping DNA Rekombinase der Hefe
FRT	Erkennungssequenz der FLP Rekombinase
gDNA	genomische DNA
gfp	Genesequenz des Green Fluoreszenz Protein
GFP	Green Fluoreszenz Protein
Gin	G inversion Rekombinase
gix	Erkennungssequenz der Gin Rekombinase
GmHSP17.5E	Hitzeschockpromotorsequenz aus <i>Glycine max</i>
GUS	β-Glucuronidase

h	Stunde
HSP	Hitzeinduzierbarer Promotor HSP17.5E aus <i>Glycine max</i>
IgG	Immunglobulin G
iPCR	inverse PCR
LB	Left Border Sequenz von dem Ti-Plasmid aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
loxP	locus of crossing over, Erkennungssequenz der Cre Rekombinase der Bacteriophage P1
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MS	Murashige-Skoog
NOS	Terminatorsequenz der Nopalinsynthase
OCS	Terminatorsequenz der Octopinsynthase
Pa	Pascal
PCR	Polymerase Chain Reaction
psi	pounds per square inch
R	Rekombinase aus Hefe
RB	Right Border Sequenz von dem Ti-Plasmid aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Erkennungssequenz der Rekombinase R
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSC	Saline Sodium Citrat
STLS-1	Sequenz des ersten Introns des Light Sensitivity Gens aus <i>Solanum tuberosum</i>
T ₀	Regenerierte Generation von transformierte Pflanzen
T ₁	Generation von Nachkommen der T ₀
T ₂	Generation von Nachkommen der T ₁
T35S	Terminatorsequenz aus dem 35S CaMV
Tab.	Tabelle

TBS	TRIS buffered saline
T-DNA	Transfer DNA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
Ubi	Ubiquitinpromotor 1 aus Mais
<i>uidA</i>	β -Glucuronidasegen
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
w/v	Weight per volume, Masse pro Volumen Verhältnis
v/v	Volume per volume, Volumen pro Volumen Verhältnis
X-GlcA	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid Cyclohexylammoniumsalz

Anhang

Global DNA alignment. Mol 1 FLP (1 to 1272) Mol 2 FLPo pure (1 to 1272)
 Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence View: Similarity Format, Color behind non-matches

FLP	1	atgccacaatttgataatattatgtaaaacaccacctaaggtgcttgttcgtcagtttgtgaaaggttggaaagaccttcaggtgagaaa
FLPo	1	atgccgcagttcgacatcctttgcaagactccgcctaaggttctgtgtgagcagttcgtggagaggttcgagagccatctggtgagaag
FLP	91	atagcattatgtgctgctgaactaacctattatgttggatgattacacataacggaacagcaatcaagagagccacattcatgagctat
FLPo	91	atgccctgtgcccgtgagctgacctaccctttgttggatgattaccacaatggcaccgctatcaagagggctacctcatgctctac
FLP	181	aatactatcataagcaattcgctgagtttcgatattgtcaataaatcactccagtttaaatacaagacgcaaaaagcaacaattctggaa
FLPo	181	aacaccatcatctcaaacctcctttcttcgacatcgttaacaatcctccagttcaagataaagaccagaagccaccatcctggag
FLP	271	gcctcattaaagaatttgatcctgcttgggaatttacaattatccttactatggacaaaaacatcaatctgatatactgatattgta
FLPo	271	gcttccctgaagaagctgatcctgcttgggagttcaccatcatccgctactacggacagaagcaccagtcagacatcaccgacatcgtg
FLP	361	agtagtttgcaattacagttcgcaatcatcggaagaagcagataagggaaatagccacagtaaaaaatgcttaagcacttctaagtggag
FLPo	361	tctctcttcagctccagttcgagtcctctgaggagccgacaagggcaatccacactccaagaagatgctgaagccctctgtccggag
FLP	451	ggtgaaagcatctgggagatcactgagaaaaactaataatcggttggatatacttcgagatttacaacaaaaaaactttataccaattc
FLPo	451	ggcgagtcctatctgggagatcaccgagaagatcctgaactccttcgagatacctccaggttcaccaagacaaaaacctttaccagttc
FLP	541	ctcttctagctactttcatcaattgtggaagattcagcgataataagaacgttgatccgaaatcatttaaattagtccaaaaaagtat
FLPo	541	ctgttccctggccaccttcatcaactggcgcaggttctccgacatcaagaacgtggacccaagctcttcaagctgggtcagaacaagtac
FLP	631	ctgggagtataatccagtgcttagtgacagagacaagaacagcgttagtaggcacataacttctttagcgcgaaggggtaggatcgtat
FLPo	631	ctgggtgttatcatccagtgcttggtagccgagaccaagacctcctgtccagggcacatctacttcttccgctagagggcaggatcgac
FLP	721	ccacttgtatatttggatgaatttttgaggaattctgaaccagtcctaaaacgagtaaataggaccggcaattcttcaagcaataaacag
FLPo	721	cctctggtgtaccttgacgagttcctgaggaactccgagccggtgctgaagagggttaacaggaccggcaactcctcctcaacaagcag
FLP	811	gaataccaattatataaagataacttagtcagatcgtacaataaagcttgaagaaaaatgccccttattcaatctttgctataaaaaat
FLPo	811	gagtagcagctgctgaaggacaacttggtagggtcctacaacaagggcctgaagaagaatgctccgtaactccatcttcccatcaagaac
FLP	901	ggcccaaaatctcacatggaagacatttgatgacctatttcttcaatgaagggcctaacggagttgactaatgttggggaaattgg
FLPo	901	ggaccaaaagtcccacatcggcagggcacttgatgacctccttcttccatgaagggcctgaccgagctgaccaactggtgggcaactgg
FLP	991	agcgataagcgtgcttctgcccgtggccaggacaacgtatactcatcagataaacagcaatacctgatcactacttcgcactagtttctcgg
FLPo	991	tctgacaagagagcctccgcccgtggccaggaccactacaccaccagatcaccgcatcgggaccactacttcgcccctggtgtccagg
FLP	1081	tactatgcataatgatccaatatacaaggaaatgatagcattgaaggatgagactaatccaatgaggagtgccagcacatagaacagcta
FLPo	1081	tactatgcttacgacctatctccaaggagatgatcgcccttaagagcagaccaaccggatcgaggagtgccagcacatcgagcagctt
FLP	1171	aagggtagtgctgaaggaagcatagcatacccccgatggaatgggataaatcacaggaggtactagactacctttcatcctacataaat
FLPo	1171	aaaggctccgcccagggtcaatcagatacccccgtggaacggcaccatctcccaggaggtctggactacctgtcttccatatacaac
FLP	1261	agacgcatataa
FLPo	1261	agggagatctga

Abbildung 32: Sequenzvergleich des *flp* Gens aus Hefe und der veränderten Sequenz *flpo*

Vergleich der DNA Sequenz der FLP aus Hefe und dem kodonoptimierten Gen für eine Expression in Mais. In der Sequenz wurden seltene oder suboptimale Kodons durch von Mais bevorzugt genutzte Kodons ersetzt, darüber hinaus wurden kryptische Spleißstellen sowie Polyadenylierungssequenzen aus dem Gen entfernt. Der G/C Gehalt wurde von 36,9 % in der natürlichen Sequenz auf 54,9 % in der neuen Sequenz angehoben. Insgesamt wurden 352 Basenpaare ausgetauscht (rot unterlegt), welches 28 % des 1272 bp großen Rekombinasegens entspricht. Die gebildete Aminosäuresequenz wurde dabei nicht verändert.

■ Homology Block: Percent Matches 100 Score 848 Length 424

Sequence View: Difference Format, Color behind non-matches

```
FLP          1 mpqfdilcktppkvlvrqfverferpsgekialcaaeltylcwmithngt
FLPo         1 .....

FLP          151 aikratfmsyntiisnslsfdivnkslqfkyktqkatileaslkkclipaw
FLPo         151 .....

FLP          301 eftiipyggqkhqsditdivsslqlqfesseeadkgnshskkmlkallse
FLPo         301 .....

FLP          451 gesiweitekilnsfeytsrftkktlyqflflatfincgrfsdiknvdp
FLPo         451 .....

FLP          601 ksfklvqnkylgviiqclvtetktsvsrhiyffsargridplvyldflr
FLPo         601 .....

FLP          751 nsepvlkrvnrtgnsssnkqeyqlkdnlvrsynkalkknapsifaikn
FLPo         751 .....

FLP          901 gpkshigrhlmtsflsmkglteltnvvgnwsdkrasavarttythqitai
FLPo         901 .....

FLP          1051 pdhyfalvsryyaydpiskemiaalkdetnpieewqhieqlkgsaegsiry
FLPo         1051 .....

FLP          1201 pawngiisqevldylssyinrri*
FLPo         1201 .....*
```

Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenz der FLP Rekombinase und der FLPo

Nach der Optimierung der DNA Sequenz der FLP Rekombinase für eine Expression in Maiszellen, durch Anpassung in der Kodonnutzung, dem G/C Gehalt und der Entfernung von kryptischen Spleißstellen sowie Polyadenylierungsmotiven, wurde diese FLPo genannt. Mit Hilfe des Programms CloneManager 9 wurden die gebildeten Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen DNA Sequenzen miteinander verglichen. Die Veränderungen an der DNA Sequenz hatte keinen Einfluss auf die sich anschließend bildende Aminosäuresequenz. FLP: Aminosäureabfolge, die nach der Translation des *flp* Gens der Hefe gebildet wird. FLPo: Aminosäureabfolge, die nach der Translation des *flpo* Gens gebildet wird.

Genomspezifische Primer		
Bezeichnung	Sequenz (5' - - 3')	Funktion
4S1F	CCTCTCCCTTTCTGCTGCTCGGAAATTATTGC	Amplifikation des Integrationsorts von pGermlinEx1-3440
4S1R	GCTCAAGGCGATTTGAGTTTCTAGCCCTAC	
4S2F	TTTGTCCAGCCCTAACCACGACGCATCGCACTC	
4S2R	AAGAAGTCGTAGCGCGTGTGGGTCTGGGATT TG	
4711 IP A	AGAGTGAAGTACTAGTGAAGAGCCCGACTGTTGA GC	Amplifikation des Integrationsorts von pGermlinEx2-4711
4711 IP B	GCACCAACTGTATAAGCGAGCCAACTGAGACTG	
4711 IP C	CATGCCACTCGCGGCTGTGCAATCACAGTGTAG	
4711 IP D	CACCCTGTCTCGATCTGTCTCAGGGCTGTTTAG	
4711 IP X	GCCACAGAAAGGCACCGCCGCACAAGATCCTGATC	
3S1F	TGCCTTGTAGGAGTATCCGGCCTTCTCGCGGTTT	Amplifikation des Integrationsorts von pGermlinEx1-3735 Chromosom 3
3S1R	CCAGCGCGGTGATAAGAGCGTGATGGTGTGTTGG	
3S2F	GCTGTGCTGAAAGCAGCTACTACTAGCAGATGTG	
3S2R	CCCTTGTGCTTGTGCATTCTATGCCATCTCAAC	
3735 IP 4A	CCCAACATGCGCAATTGGGTGCAAGACTTTGTG	Amplifikation des Integrationsorts von pGermlinEx1-3735 Chromosom 4
3735 IP 4B	GACATAGGTATCGACTTCGTGGAGGCACTACCC	
3735 IP 4C	CGGAATGGTGTCTCGTGGAGTGAGGACTGGTAAGC	
3735 IP 4D	TCCTGGTAGGACACCTGGCGGTGATGCTTGTCG	
3715 IP A	AGCTACAAGGCTACCGCTGTCTGTGCTGCTTAC	Amplifikation des Integrationsorts von pGermlinEx1-3715
3715 IP B	CCGTCTGTCCATTTGCTAGTGCTCGGTAATC	
3715 IP C	AACGCCATGTTGGTGCATCTGGAGCAGACAAG	
3715 IP D	ATCGTTGCCATGACCGAGTCCACATTTCTCAG	

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Wienand für die Betreuung der Arbeit und die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Kehr für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dirk Becker, für das Einwerben des Projektes, das Vertrauen, das er immer wieder in mich und meine Fähigkeiten gesetzt hat und die vielen anregenden Gespräche.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank auch Julia Sandberg-Meinhardt, für die Unterstützung bei der Transformation der Pflanzen, deren Analyse und bei der Verhinderung von völliger Unordnung im Labor.

Dr. Hermann Schmidt danke ich für die Klonierung der Grundvektoren und die kompetente Beratung in alle Klonierungsfragen.

Auch danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit, die ich hier verbringen durfte. Insbesondere bei Nadja Schmidt, Benjamin Möller und François Perrineau.

Für die vielfältige Unterstützung in der gesamten Zeit möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, insbesondere bei meiner Freundin Katja, die mir in anstrengenden Zeiten den Rücken freigehalten und immer an mich geglaubt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 28.03.2013