

# Sequenz-spezifische Rekombination in *Zea mays* L.

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
des Fachbereiches Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von Sandra Kerbach  
aus Rostock

Hamburg 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. LÖRZ  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Pofessor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 10. Dezember 2004

Hamburg, den 11. November 2004



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	1
<b>A Zusammenfassung</b>	3
<b>B Einführung</b>	6
1 Bedeutung der Gentechnik in der Landwirtschaft	7
2 Eliminierung von Selektionsmarkern	9
2.1 Verschiedene Methoden zur Eliminierung von Markergenen	11
2.2 Gerichtete, sequenz-spezifische Exzision	12
2.2.1 Das Rekombinationssystem Cre/loxP	15
2.2.2 Das Rekombinationssystem Flp/FRT	17
3 Zielgerichtete Integration	18
4 Ziel dieser Arbeit	20
<b>C Material und Methoden</b>	21
1 Chemikalien, Enzyme, sonstige Verbrauchsmaterialien	22
2 Bakterien, Pflanzenspezies und Anzuchtbedingungen	22
2.1 <i>Escherichia coli</i>	22
2.2 Mais ( <i>Zea mays</i> L.)	22
2.3 Weizen ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	23
3 Plasmide	23
4 Oligonukleotide	24
5 Antikörper	25
6 Molekularbiologische Methoden	26
6.1 Transformation von monokotylen Gewebe	26
6.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA	27
6.2.1 Standardmethoden	27
6.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	27
6.2.3 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA	27
6.2.4 Markierung von DNA	28
6.2.5 Southern Blot-Analyse	28
6.3 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA	29
6.3.1 Isolierung von RNA	29
6.3.2 Northern Blot-Analyse	29
6.4 Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen	29
6.4.1 Isolierung von Gesamtproteinen	29
6.4.2 Western Blot-Analyse	30
6.5 Histochemischer GUS-Test	30
<b>D Ergebnisse</b>	31
1 Klonierung der Transformationsvektoren	32
1.1 Klonierung des Vektors pUbi::cre	32
1.2 Klonierung des Vektors pAct1::flp	32

---

1.3	Klonierung der Vektoren pUbi.2lox.pat und pUbi.2FRT.pat	33
1.4	Klonierung der Vektoren plox.gus bzw. pFRT.gus	35
2	<i>In vitro</i> -Rekombination	36
3	Transiente Expressionsanalysen im monokotylen Weizen	38
3.1	<i>In vivo</i> -Rekombination mit dem Cre/loxP-System	38
3.2	<i>In vivo</i> -Rekombination mit dem Flp/FRT-System	40
4	Stabile Transformation von Mais	42
4.1	Transgennachweis	43
4.1.1	Nachweis der Integration des cre-Rekombinasegens	43
4.1.2	Nachweis der Integration des flp-Rekombinasegens	45
4.1.3	Nachweis des loxP-flankierten Selektionsmarkers	46
4.1.4	Nachweis des FRT-flankierten Selektionsmarkers	48
4.2	Transkription der Rekombinasegene in T <sub>0</sub> -Pflanzen	48
4.3	Translation der Rekombinase in T <sub>0</sub> -Pflanzen	50
4.4	Nachweis der stabilen Vererbung der Transgene	50
5	Nachweis der Rekombination in der F <sub>1</sub> -Generation	52
5.1	Kreuzung von Rekombinase- mit Erkennungssequenzen-tragenden Linien	52
5.2	Southern Blot-Analysen	53
5.3	Sequenzanalysen durch PCR	58
6	Nachweis der Rekombination in der F <sub>2</sub> -Generation	62
6.1	Transiente Transformation	62
6.2	Southern Blot-Analysen	64
6.3	Analyse zur Segregation der Transgene in der F <sub>2</sub> -Generation	67
6.4	Sequenzanalysen durch PCR	69
6.5	Cre-Nachweis in der F <sub>2</sub> -Generation	71
6.6	Nachweis der Rekombination in Nachkommen von F <sub>2</sub> -Pflanzen	71
<b>E</b>	<b>Diskussion</b>	73
1	Sequenz-spezifische Exzision	74
2	Hinweise auf gerichtete Integrationsereignisse	79
3	Transiente Anwesenheit der Rekombinase	82
4	Vergleichende Betrachtungen der beiden verwendeten Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT	83
5	Ausblick	85
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	87
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	101
	<b>Lebenslauf</b>	103

---

**A Zusammenfassung**

Die Nutzung gentechnischer Methoden gewinnt in der Pflanzenzüchtung zunehmend an Bedeutung. Neben der Einführung von agronomischen Eigenschaften, wie z. B. Herbizidresistenzen, sind die Verbesserung der Produktqualität und die Erzeugung sogenannter nachwachsenden Rohstoffe neuerliche Anwendungsgebiete der Gentechnologie.

Bei der Erzeugung transgener Pflanzen wird neben dem Gen von Interesse zusätzlich ein Selektionsmarkergen übertragen, das die Identifikation von transgenem Gewebe ermöglicht. Öffentliche Vorbehalte richten sich besonders gegen die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen zu Selektionszwecken. Auch die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit verweist auf Umweltrisiken durch Antibiotikaresistenzmarker und bewertet die Resistenzen hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung. Auf lange Sicht ist es daher vorzuziehen, die nach der Selektion der transgenen Pflanzen überflüssig gewordenen Markergene zu eliminieren und nur für die Leistung der Nutzpflanze nötigen Transgene zu erhalten.

Eine effiziente Möglichkeit zur Eliminierung von Markergenen stellen sequenz-spezifische Rekombinationssysteme aus Prokaryoten, z. B. Cre/loxP aus dem P1-Bakteriophagen, und niederen Eukaryoten, z. B. Flp/FRT aus Hefe, dar. Eine Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei identischen, spezifischen Erkennungssequenzen. Da die Rekombinase-vermittelte Exzision reversibel ist, bieten solche Systeme neben der sequenz-spezifischen Eliminierung von Markergenen auch die Möglichkeit zur gerichteten Integration von Erkennungssequenzen-tragenden Fremdgenen. Eine derartige Strategie kann vor unvorhersehbaren Positionseffekten schützen. Nach Etablierung einer einzelnen Erkennungssequenz im Zielgenom kann durch Rekombinase-vermittelte Rekombination die Integration von Erkennungssequenzen-tragenden Transgenen genau an der Erkennungssequenz im Zielgenom stattfinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Möglichkeiten zur Anwendung der sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT in *Zea mays* L. untersucht.

Dazu wurden Genkonstrukte mit Erkennungssequenzen bzw. den dazugehörigen Rekombinasegenen kloniert. Deren Funktionalität wurde anschließend in *in vitro*-Tests und transienten Analysen in zygotischen Weizenembryonen untersucht. Dabei konnten sowohl Exzisions- als auch Integrationsereignisse nachgewiesen werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden transgene Maispflanzen mit den Rekombinase- bzw. Rekombinaseerkennungssequenzen hergestellt. Insgesamt wurden 2901 unreife Maisembryonen biolistisch transformiert. Mit einer Transformationseffizienz von durchschnittlich 2,7 % konnten insgesamt 46 transgene Pflanzen hergestellt werden, die mindestens eine vollständige Transgenkopie aufwiesen. Kreuzungen von Maispflanzen, die den von Erkennungssequenzen flankierten Selektionsmarker tragen, mit Pflanzen, die die

korrespondierende Rekombinase konstitutiv exprimieren, führten zur Kombination der beiden Komponenten der Rekombinationssysteme in den Nachkommen. In diesen Nachkommen konnte die erfolgreiche und sehr effiziente sequenz-spezifische Eliminierung des Selektionsmarkers nachgewiesen werden. Die präzise Exzision des Markers konnte durch Sequenzierung bestätigt werden.

Nachkommen dieser Pflanzen, die eine verbleibende Erkennungssequenz und das Rekombinasegen trugen, bildeten die Grundlage für erste weiterführende Experimente zur gerichteten Integration von Transgenen. Unreife Scutella wurden transient mit einem promotorlosem Reporter gen mit nur einer Erkennungssequenz transformiert. In rekombinanten Embryonen konnten deutlich mehr transiente Signale beobachtet werden als in nicht-transgenen Embryonen, die mit dem gleichen promotorlosem Reporter gen transformiert wurden, und damit Hinweise auf eine gerichtete Integration geben.



## 1 Bedeutung der Gentechnik in der Landwirtschaft

Bereits zum Ende der Mittelsteinzeit, vor circa 10.000 Jahren, begann der Mensch die Domestizierung von Pflanzen. Der damit einsetzende Ackerbau umfasste schon bald verschiedene Getreidesorten, wie Weizen, Gerste oder Reis. Gleichzeitig entwickelten sich durch das Bedürfnis, die kultivierten Pflanzen an die jeweiligen Nachfragen der Menschen, wie Ertragsmenge oder Qualität, anzupassen, rege Selektionsstrategien. Mitte des 19. Jahrhunderts versuchte der Mensch, mithilfe von Kreuzungen pflanzliche Eigenschaften neu zu kombinieren und vorteilhafte Eigenschaften zu etablieren. In der jüngeren Vergangenheit (seit den 1920er Jahren) wurden Chemikalien zur Erzeugung neuer genetischer Eigenschaften verwendet, z. B. Colchizin zur Auslösung von Polyploidie, oder Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung zur Mutagenese pflanzlicher Genome (zur Übersicht: Kuckuck *et al.*, 1985). Seit 1983 vier unabhängige Arbeitsgruppen erstmalig Pflanzen mit Fremdgenen erzeugen konnten (Bevan *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Murai *et al.*, 1983), gewinnt die Nutzung gentechnischer Verfahren in der Pflanzenzüchtung zunehmend an Bedeutung. Mittels gentechnischer Methoden ist es möglich, vorteilhafte Gene in den Organismus einzubauen oder unerwünschte in ihrer genetischen Ausprägung zu inhibieren. Der Unterschied zur traditionellen, klassischen Züchtung und damit ein großer Vorteil der „grünen“ Gentechnologie liegt darin, dass die Änderungen gezielt herbeigeführt werden können und es möglich ist, Gene artübergreifend zu kombinieren (zur Übersicht: Saedler und Schuchert, 2001).

In den vergangenen Jahren konnten durch den Einsatz von Gentechnologie in der Pflanzenzüchtung verschiedene agronomische Eigenschaften eingeführt werden. Unter dieser Prämisse konnte beispielsweise eine breite Palette an herbizidresistenten Kultursorten hergestellt werden, die den Einsatz von umweltverträglicheren Herbiziden ermöglicht (zur Übersicht: Schütte und Schmitz, 2001). Jährlich geht etwa ein Drittel der Welternte durch Insekten, Krankheiten und Unkräuter verloren (zur Übersicht: Saedler, 1994); solche Resistenzsysteme sind ein wichtiger Ansatzpunkt für die kommerzielle Produktion von transgenen Pflanzen. So enthalten beispielsweise 53 % der EU-weit von 1991 bis 2002 freigesetzten transgenen Pflanzen eine Herbizidtoleranz (zur Übersicht: Vries *et al.*, 2003).

Neben Resistenzen führen neuerliche Forschungen verstärkt zur Verbesserung der Produkteigenschaften transgener Pflanzen. So konnte mit dem sog. „Golden Rice“ durch die Übertragung von vier Enzymen für den  $\beta$ -Carotinoidstoffwechsel eine Reissorte mit erhöhtem Provitamin A ( $\beta$ -Carotinoid)-Gehalt entwickelt werden (Burkhardt *et al.*, 1997). In Regionen, wo der Vitamin A-arme Reis die Hauptnahrungsquelle darstellt, kommt es als Folge von

Vitamin A-Mangel zu Augenkrankheiten bis hin zur Blindheit. „*Golden Rice*“ bietet der Bevölkerung eine gesundheitsfördernde Alternative.

Die Entwicklung von gliadinfreien Lebensmitteln, z. B. Weizen (Folck, 2004), die Erhöhung des Gehalts an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z. B. in Raps (Knutzon *et al.*, 1999), oder die Anreicherung von essentiellen Aminosäuren, z. B. in Mais (Mazur *et al.*, 1999), sind aktuelle und zurzeit beforschte Einsatzfelder der pflanzlichen Gentechnologie.

Vielversprechend ist auch der Einsatz von transgenen Pflanzen als Produktionssysteme für nachwachsende Rohstoffe bzw. als Produzenten verschiedener Inhaltsstoffe. So konnten Imani und Mitarbeiter (2002) die Produktion von Impfstoffen in Möhren durch die Einführung und Expression eines Hepatitis B-Virus-Gens in Karottenzellen ermöglichen. Auch die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen, wie z. B. Kartoffelstärke zur Herstellung von Papier, Kleister und Arzneimitteln, kann durch gentechnologische Methoden verbessert werden. Die aus Amylose und Amylopektin bestehende Stärke muss zur industriellen Verarbeitung separiert werden. Die unterschiedlichen Eigenschaften bedingen völlig verschiedene Anwendungen. Etwa 75 % des industriellen Bedarfs wird durch die Amylopektin-Stärke abgedeckt. Durch eine *antisense*-Strategie konnte das Gen für die Amylose-erzeugende Stärkesynthese in der Kartoffel ausgeschaltet und somit amylosefreie Kartoffeln erzeugt werden (zur Übersicht: Peerenboom, 1996).

Die Herstellung transgener Pflanzen geht bei allen bisherigen Transformationsmethoden mit der gleichzeitigen Einführung des Wunschgens mit einem Selektionsmarker einher. Mithilfe des Selektionsmarkergens können transformierte von nicht-transformierten Zellen unterschieden werden.

Als Selektionsmarker werden häufig Antibiotikaresistenzgene eingesetzt (zur Übersicht: Brandt, 1999), z. B. das Resistenzgen *bla* aus dem Tn3-Transposon. Diese Gen codiert das Enzym  $\beta$ -Lactamase, welches das Antibiotikum Ampicillin inaktiviert (Sykes und Mathew, 1976). Weit verbreitet sind auch andere Antibiotikaresistenzen, wie gegen Kanamycin (*nptII*-Gen aus dem bakteriellen Transposon Tn5, Bevan *et al.*, 1983), Hygromycin (*hph*-Gen aus dem Darmbakterium *Escherichia coli*, Van Den Elzen *et al.*, 1985) oder Streptomycin (*aadA*-Gen aus dem Transposon Tn7, Hollingshead und Vapnek, 1985).

Des weiteren finden ebenfalls sehr häufig Herbizidresistenzgene Anwendung als selektionierbare Marker, beispielsweise die Gene *bar* (De Block *et al.*, 1987) oder *pat* (Eckes *et al.*, 1989) aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten, die für die Phosphinothricin-N-Acetyltransferase codieren und eine Resistenz gegen Glufosinate (z. B. Basta<sup>®</sup>) vermitteln. Auch das Resistenzgen *aroA* aus *Salmonella typhimurium*, dessen Genprodukt, die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat synthase, eine Resistenz gegenüber dem Glyphosat-Herbizid Roundup<sup>®</sup> vermittelt (Comai *et al.*, 1985), wird zur Selektion transgener Zellen

eingesetzt. Gegen Sulfonylharnstoffe (z. B. GLEAN<sup>®</sup> von Dupont<sup>™</sup>) existieren ebenfalls Resistenzgene, wie z. B. das Acetolactatsynthasegen *csr* aus *Arabidopsis thaliana*, das als Selektionsmarker in transgene Pflanzenzelle eingebracht werden konnte (Haughn *et al.*, 1988).

Um das Spektrum an möglichen Selektionsmarkern zu erweitern und Alternativen zu bestehenden Resistenzgenen zu bieten, verstärkten sich in den vergangenen Jahren die Bemühungen, neue Markersysteme zur Verfügung zu stellen.

Eine Möglichkeit bietet die optische Selektion in einigen Pflanzenarten. So dient zum Beispiel das *Green Fluorescent Protein* (GFP) aus *Aquaporea victoria* als visueller Selektionsmarker in diversen Arten, wie Gerste (Chen *et al.*, 2003), Reis (Vain *et al.*, 1998), Papaya (Zhu *et al.*, 2004) und Zuckerrübe (Zhang *et al.*, 2001). Da der Arbeitsaufwand für die visuelle, mikroskopische Auswertung sehr hoch ist, sind solche Selektionsverfahren für die Herstellung transgener Nutzpflanzen mit oft geringer Transformationseffizienz ungeeignet. Des weiteren zeigen viele pflanzliche *in vitro*-Kulturen eine der *gfp*-Expression vergleichbare Eigenfluoreszenz, die eine effektive Selektion unmöglich macht.

Durch den Gebrauch von physiologischen Markern, kann eine transgenen Pflanze Stoffe umsetzen, die sonst nachteilig auf die Pflanze wirken (zur Übersicht: Brandt, 2001). Beispielsweise nutzen Pflanzen Mannose normalerweise nicht als Zuckerquelle. Das Einbringen des Phosphomannoseisomerasegens *pmi* aus *E.coli*, dessen Genprodukt den Metabolismus von Mannose in Pflanzenzellen und die nachfolgende Kultivierung auf Medien mit Mannose ermöglicht, erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen transgenem und nicht-transgenem Pflanzenmaterial. Dieses positive Selektionsverfahren konnte erfolgreich in verschiedenen Arten eingesetzt werden, so in *Arabidopsis thaliana* (Todd und Tague, 2001), Mais (Negrotto *et al.* 2000), Reis (He *et al.* 2004), Weizen (Wright *et al.* 2001), Hirse (O’Kennedy *et al.*, 2004), Maniok (Zhang *et al.*, 2000) und Zuckerrübe (Joersbo *et al.*, 1998). Einem ähnlichen Ansatz folgt die Verwendung des Selektionsmarkers Xylulose Isomerase *xylA* aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes*. Durch die *xylA*-vermittelte Verwertung von Xylose konnten Haldrup *et al.* (1998) eine positive Selektion in Kartoffel und Tomate ermöglichen.

## 2 Eliminierung von Selektionsmarkern

Den bisher besprochenen Selektionsmethoden ist gemein, dass die stabil integrierten Markergene nur zur Selektion transformierter Pflanzenzellen genutzt werden und nach der Selektion keine Funktion mehr innehaben. Eine Ausnahme bilden hierbei die Herbizidresistenzgene, die gezielt zur kommerziellen Nutzung eingeführt werden.

Öffentliche Vorbehalte richten sich besonders gegen die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen zu Selektionszwecken; diese Bedenken betreffen hauptsächlich eine abnehmende Wirkung von Antibiotika in der klinischen Anwendung.

Bereits 1997 sprach sich die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS), das die deutsche Zulassungsbehörde beratende Expertengremium, dafür aus, sich bei der Übertragung von Fremdgenen auf diejenigen zu beschränken, die für das neue, gewünschte Merkmal codieren und technisch bedingte oder nicht genau bekannte Gensequenzen außen vor zu lassen.

Die seit Oktober 2002 gültige EU-Richtlinie 2001/18/EG verlangt eine „schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in GVO“ (Gentechnisch veränderte Organismen; Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, 2001). Ein am 2. April 2004 angenommenes Gutachten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, <http://www.efsa.eu.int>) bewertet die Umweltrisiken durch Antibiotikaresistenzmarker und teilte die Resistenzen hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung in drei Gruppen. Dabei werden beispielsweise gegen die Resistenzgene *npfl* und *hph*, die Resistenzen gegen Kanamycin bzw. Hygromycin vermitteln, keine Sicherheitsbedenken geäußert, da diese Antibiotika eine weite natürliche Verbreitung haben und in der Humanmedizin selten angewendet werden. Dagegen soll die Verwendung von Resistenzen gegen Ampicillin und Streptomycin auf experimentelle Freilandversuche beschränkt bleiben und nicht in Pflanzen enthalten sein, die in Verkehr gebracht werden sollen. Eine dritte Gruppe von Antibiotikaresistenz-Markergenen umfasst Resistenzen gegen Antibiotika, die eine aktuelle Bedeutung in der klinischen Anwendung innehaben. Solche GV-Pflanzen sind weder für Freilandversuche noch für das Inverkehrbringen vorgesehen.

Trotz alternativer Markersysteme ist es auf lange Sicht vorzuziehen, die nach der Selektion der transgenen Pflanzen überflüssig gewordenen Markergene zu eliminieren und nur für die Leistung der Nutzpflanze nötigen Transgene zu erhalten.

Damit begegnet man aber nicht nur der ablehnenden Haltung der Öffentlichkeit. Einen großen Vorteil für die pflanzliche Gentechnologie eröffnet auch die Möglichkeit zur Mehrfachnutzung des gleichen Markers. Vor dem Hintergrund, dass für jede Pflanzenspezies nur eine beschränkte Anzahl an Markern zur Verfügung steht, ist die Eliminierung der Markergene nach der Selektion ein wesentlicher Vorteil bei Transformation mit mehreren Genen zur Schaffung komplexer Eigenschaften in transgenen Pflanzen (sog. „*gene stacking*“). Die Entfernung der nach der Selektion abkömmlich gewordenen Markergene vermied zugunsten der wiederholten Nutzung den fortwährenden Einsatz neuer Marker, wie es beispielsweise die vegetative Vermehrung der Kartoffel erforderlich machen würde.

---

Auch bei der sexuellen Fortpflanzung durch Kreuzung könnte die Nutzung von gleichen Markergensequenzen zu unbeabsichtigten Interaktionen (z. B. *gene silencing*) führen (zur Übersicht: Meyer und Saedler, 1996; Matzke und Matzke, 1998; Wolffe und Matzke, 1999).

## 2.1 Verschiedene Methoden zur Eliminierung von Markergenen

Die Entfernung von Markergenen (zur Übersicht: Yoder und Goldsbrough, 1994; Puchta, 2000; Ebinuma *et al.*, 2001; Hohn *et al.*, 2001; Hare und Chua, 2002) kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden, als da wären: Co-Transformation, Transposition oder Rekombination. Diese seien im folgenden erklärt.

In der Regel werden Marker- und Wunschgen aneinander gekoppelt in die Pflanze transferiert und integrieren an einem Genlocus (Pawlowski und Somers, 1998; Wakita *et al.*, 1998). Sie werden meist als Einheit an die Nachkommen weitergegeben. Wenn Markergen und Zielgen an verschiedenen Orten im pflanzlichen Genom eingebaut werden, also unabhängig, ungekoppelt sind, segregieren sie in den Nachkommen. Dies kann zur Eliminierung von Markergenen genutzt werden. Diese Methode der sog. Co-Transformation konnte erfolgreich zur Markerentfernung aus verschiedenen Pflanzenspezies gezeigt werden (zur Übersicht: Ebinuma *et al.*, 2001). Damit Ziel- und Markergen unabhängig in verschiedene Chromosomen integrieren und damit das Zielgen in der nächsten Generation vom Markergen getrennt werden kann, werden zur Agrobakterien-vermittelten Transformation verschiedene Bakterienstämme mit je einem Vektor, auf denen sich Ziel- und Markergen befinden, verwendet (McKnight *et al.*, 1987; De Neve *et al.*, 1997). Neue Entwicklungen zeigten, dass auch der Einsatz eines Agrobakterienstammes mit zwei Vektoren (Daley *et al.*, 1998) oder sogar zwei separate T-DNAs auf einem Vektor (Komari *et al.*, 1996) nach sexueller Kreuzung zur erfolgreichen Eliminierung vom Markergen führt. Da die Wahrscheinlichkeit, mit der tatsächlich beide Gene in eine Zelle eingebaut werden, sehr gering ist, kann diese Strategie der Co-Transformation nur in Systemen mit einer hohen Transformationseffizienz angewendet werden.

Die Entfernung unerwünschter Markergene kann auch durch die Nutzung von sogenannten „springenden Genen“, Transposons, verwirklicht werden, die ihre Position im Genom verändern können. Solche transponierbaren Elemente bestehen aus einem Gen für eine Transposase und Erkennungssequenzen, die von der Transposase erkannt werden. Um diesen Mechanismus zur Markereliminierung nutzen zu können, braucht es von Erkennungssequenzen flankierte Markergene. Die eingekreuzte oder gleichzeitig eingeführte Transposase erkennt die spezifischen Sequenzen und trennt die DNA an diesen auf. Das

dazwischen befindliche Markergen wird zufällig an einer anderen Stelle im Genom integriert (Goldsbrough *et al.*, 1993; Ebinuma *et al.*, 1997). Da Marker- und Zielgen nun räumlich entkoppelt sind, kommt es zur Segregation in der Nachkommenschaft; einige Nachfahren tragen dann nur das Zielgen.

Unter Rekombination versteht man die Spaltung und Neuverknüpfung, also das Neuarrangement von DNA. Man unterscheidet homologe von sequenz-spezifischer Rekombination. Beides kann zur Entfernung von Markergenen genutzt werden. Die Anwesenheit von ausgedehnten homologen DNA-Sequenzen zu beiden Seiten des Markers kann eine zufällige Rekombination und Eliminierung dieses Gens ermöglichen (zur Übersicht: Puchta, 2003). Sehr exakt arbeiten *site*-spezifische Rekombinationssysteme aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten, die aus einer Rekombinase und sehr kurzen Erkennungssequenzen bestehen. Die Erkennungssequenzen werden auf beiden Seiten des Antibiotikaresistenzmarkers eingefügt, der in die Pflanzenzelle eingebracht werden soll. Sobald die transformierten Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert worden sind, wird die Rekombinase in die Pflanzenzelle eingeführt und ermöglicht die Exzision des Markers (zur Übersicht: Ow, 2002).

Da im Rahmen dieser Arbeit mit solchen sequenz-spezifischen Rekombinationssystemen gearbeitet wurde, sollen diese im weiteren Verlauf näher erläutert werden.

## 2.2 Gerichtete, sequenz-spezifische Exzision

Allen sequenz-spezifischen Rekombinationssystemen ist gemein, dass eine Rekombinase die basengenaue Rekombination innerhalb der homologen Erkennungsstellen katalysiert. Diese beiden Komponenten, die Rekombinase und die Erkennungssequenzen, führen zum Neuarrangement von DNA, ohne weitere Cofaktoren zu benötigen. In Prokaryoten sowie in niederen Eukaryoten gibt es eine Vielzahl von sequenz-spezifischen Rekombinationssystemen, wie z. B. Cre/loxP aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg und Hamilton, 1981), Flp/FRT aus dem 2  $\mu$  Plasmid aus Hefe (Broach *et al.*, 1982), R/RS aus dem Plasmid pSR1 von *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki *et al.*, 1985) oder Gin/gix aus dem Bakteriophagen Mu (Plasterk *et al.*, 1983).

Die Rekombinasen Cre, Flp, R und Gin gehören zu den Familien der Integrasen (Cre, Flp, R) oder Invertasen (Gin).

Obwohl die Aminosäure-Sequenzen der Rekombinasen sehr verschieden sind und auch die Proteingrößen stark variieren, ist der Reaktionsmechanismus konserviert. Im katalytischen Zentrum der Rekombinasen der Familie der Integrasen befinden sich die Aminosäuren

Tyrosin, Histidin und Arginin (Argos *et al.*, 1986). In diesem Bereich besteht innerhalb der Familie eine hohe Homologie. Tyrosin wird für den Strangbruch zu Beginn der Reaktion benötigt; durch den nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe werden die Phosphodiesterbrücken des DNA-Strangs aufgebrochen. Arginin dient der Bindung und Histidin der Verknüpfung der rekombinierten DNA-Stränge. Da die Energie der Phosphodiesterbrücke für die Religation der DNA-Stränge genutzt wird, sind keine weiteren Energieäquivalente nötig.

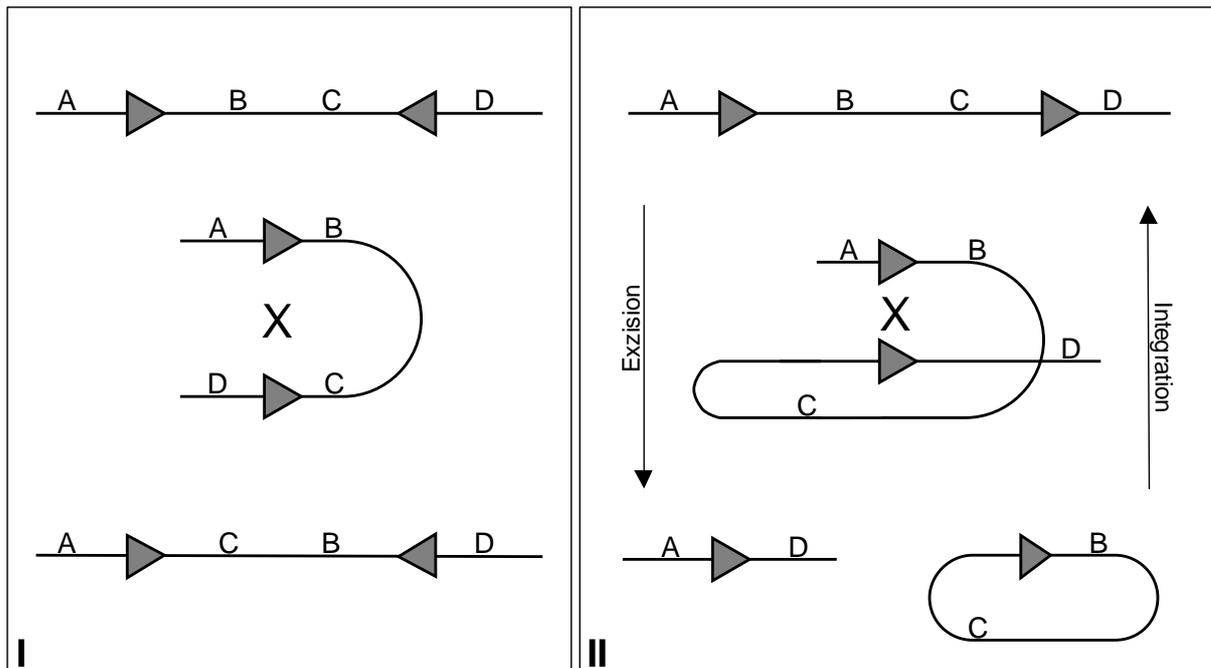
Die Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei identischen, spezifischen Erkennungssequenzen (Abb. 1).

Erkennungssequenz	<i>Inverted Repeat</i>	Spacer	<i>Inverted Repeat</i>
loxP	ataacttcgtata	atgtatgc	tatacgaagttat
FRT	gaagttcctatac	tttctaga	gaataggaacttc
RS	ttgatgaaagaa	taacgta	ttctttcatcaa
gix	ttatccaaaacc	tc	ggtttacaggaa

**Abb. 1:** Vergleich der Erkennungssequenzen der Rekombinationssysteme Cre/loxP, Flp/FRT, R/RS und Gin/gix.

Diese sogenannten *sites* bestehen aus

einem 2 bis 8 bp langen, asymmetrischen Spacer, der von *Inverted Repeats* einer Länge von 12 bzw. 13 bp flankiert wird, an denen die Rekombinase bindet. Der Spacer ist Ort des Strangbruchs und gibt aufgrund seiner Asymmetrie die Orientierung der Erkennungssequenz vor. Die relative Orientierung der Rekombinase-Erkennungsstellen zueinander bestimmt den Ablauf der Reaktion (Abb. 2). Sind die *sites* entgegengesetzt orientiert, katalysiert die Rekombinase die Inversion der dazwischenliegenden Sequenz innerhalb eines Moleküls (Abb. 2 I). Ein weiterer intramolekularer Rekombinationsprozess ist die Exzision von DNA, hierbei aber zwischen zwei gleichgerichteten *sites*. Da die daraus hervorgehenden Produkte wiederum zwei gleich orientierte Erkennungssequenzen enthalten, ist eine weitere, diesmal intermolekulare Rekombination möglich: die Integration (Abb. 2 II).



**Abb. 2:** Übersicht über die von Integrasen vermittelten Rekombinationsereignisse I) Inversion und II) Exzision/Integration.

I) Zwischen zwei entgegengesetzt orientierten *sites* befindliche DNA-Sequenz wird durch Rekombination invertiert. II) Gleichgerichtete Erkennungssequenzen führen zur Exzision des flankierten DNA-Segments; die reverse Reaktion verursacht die Integration.

Graue Dreiecke stellen die Erkennungssequenzen dar; schwarze Linien symbolisieren DNA. Rekombinationen sind durch schwarze Kreuze markiert.

Die Frage nach der natürlichen Funktion dieser sequenz-spezifischen Rekombinationen verlangt nach vielen unterschiedlichen Antworten. Neben der Erhaltung der Kopienzahl des Bakteriophagens (Cre/loxP: Austin *et al.*, 1981) und der effizienten Amplifikation einer hohen Anzahl von Plasmiden (R/RS, Flp/FRT: Futcher, 1986) ist auch die Veränderung des Wirtsspektrums (Gin/gix: Van der Putte *et al.*, 1980; Grundy und Howe, 1984) ein Grund für die Etablierung solcher Rekombinationssysteme in verschiedenen Organismen.

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

Um die Funktionsfähigkeit solcher Rekombinationssysteme in anderen Organismen zu testen, sind verschiedenste Ansätze denkbar. Durch Exzision eines Gens oder einer blockierenden Sequenz und einer damit verbundenen Expressionsmöglichkeit eines

stromabwärts gelegenen Reportergens oder durch Inversion eines Gens in *antisense*-Orientierung können Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden.

Das am intensivsten beforschte Rekombinationssystem ist das aus dem P1 stammende Cre/loxP. 1990 konnten Dale und Ow in Tabakprotoplasten Rekombinationsereignisse aufzeigen. In den darauffolgenden Jahren konnten viele Gruppen erfolgreiche Rekombination im Modellorganismus Tabak, ebenso wie in *Arabidopsis thaliana* nachweisen (Odell *et al.*, 1990; Baylay *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1992; Koshinsky *et al.*, 2000). Über den heutigen Erkenntnisstand der Forschungen und Anwendungen des Cre/loxP-Systems gibt das Kapitel 2.2.1 dieser Einführung umfassend Auskunft.

Auch Arbeiten mit dem Rekombinationssystem Flp/FRT belegen vielversprechende Ansatzmöglichkeiten zur erfolgreichen Rekombination in pflanzlichen Systemen, wie beispielsweise in Mais- und Reisprotoplasten (Lyznik *et al.*, 1993; 1996), in Tabak (Lloyd und Davis, 1994) oder in *Arabidopsis thaliana* (Sonti *et al.*, 1995; Kilby *et al.*, 1995).

Erfolgreiche Rekombinationen konnten Maeser und Kahmann 1991 in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* und Tabak mithilfe des Gin/gix-Systems nachweisen.

Gleichermaßen konnten Onouchi und Mitarbeiter (1991, 1995) die Funktionalität des R/RS-Systems in Tabakzellen aufzeigen. Weitere Arbeiten in Tabak von Matsunaga *et al.* (2002) und Sugita *et al.* (2000) zeugen von der anwendungsorientierten Weiterentwicklung dieses Systems. Sie produzierten Pappelpflanzen mit einem induzierbaren Selektionsgen, dass später durch sequenz-spezifische Rekombination eliminiert wurde.

### 2.2.1 Das Rekombinationssystem Cre/loxP

Die Cre/loxP Rekombination wurde erstmals im Bakteriophagen P1 entdeckt. loxP steht dabei für *locus of crossing-over (X) of P1 phage*, das Enzym Cre (*cyclization recombination*) katalysiert die Reaktion (Sternberg *et al.*, 1986).

Die loxP-Sequenz ist palindromisch (zwei 12 bp lange *Inverted Repeats*) mit Ausnahme seiner inneren, 8 bp langen, asymmetrischen Spacer-Region (Sternberg *et al.*, 1981; siehe Abb. 1).

Das erst als Tetramer funktionale Enzym Cre setzt sich aus vier 38,5 kDa großen Monomeren zusammen. Jeweils ein Monomer bindet an einer 15 bp langen Domäne der loxP-Sequenz (Mack *et al.*, 1992), bestehend aus 13 bp des *Inverted Repeats* und den anliegenden Basen des Spacers.

Kristallographische Analysen des Cre-DNA-Komplexes identifizierten Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen (Guo *et al.*, 1997, 1999; Gopaul *et al.*, 1998), die dazu führen,

dass die vier identischen Cre-Untereinheiten einen Ring formen, in dem jede Untereinheit zwei benachbarte Untereinheiten und eine halbe loxP-site kontaktiert.

In dieser Konformation, die eine sogenannte *Hollyday junction* bildet (Deskmukh *et al.*, 1998), kommt es, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, zur Strangöffnung innerhalb der zwei asymmetrischen Spacer mit einem 6 bp großen Überhang. Die beiden geöffneten loxP-sites werden mit der jeweils anderen loxP-site kovalent verknüpft und bilden wiederum zwei vollständige loxP-Sequenzen.

Abhängig von der Orientierung dieser Erkennungsstellen können unterschiedliche Rekombinationsereignisse durchgeführt werden (siehe Abb. 2). Bei entgegengesetzter Orientierung der sites auf einem DNA-Molekül führt Rekombination zur Inversion des flankierten DNA-Abschnittes. Bei gleich orientierten sites exzisiert die Rekombinase die zwischen diesen gelegene Sequenz. Die Rückreaktion der Exzision ist die Integration zirkulärer DNA mit einer Erkennungsstelle in eine site. Die Reaktionen sind reversibel; das Reaktionsgleichgewicht liegt auf Seiten der thermodynamisch begünstigten monomolekularen Exzision.

Die natürliche Funktion des Cre/loxP-Systems des Bakteriophagen P1 besteht in der Erhaltung des Phagenplasmids in *E.coli*. Die Rekombinase Cre zerlegt die bei der Replikation entstehenden Phagendimere in Monomere und gewährleistet so eine gleichmäßige Verteilung der Phagen-DNA während der Zellteilung (Austin *et al.*, 1981).

#### Anwendung Cre/loxP in pflanzlichen Systemen

Über die gezielte Exzision von loxP-flankierten Genabschnitten existieren seit Anbeginn der Forschungen zum Cre/loxP-System unzählige Veröffentlichungen und ebnen damit den Weg zur sequenz-spezifischen Markereleminierung.

Die Strategien dieser Rekombinationen in pflanzlichen Systemen sind recht ähnlich: Ein Gen, umgeben von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen, wird in das Genom der Pflanze auf herkömmliche Weise eingeführt; durch Kreuzung oder Re-Transformation der korrespondierenden Cre-Rekombinase wird das loxP-flankierte Gen exzisiert. Dies gelang neben den schon erwähnten Arten *Arabidopsis thaliana* und Tabak (Lei *et al.*, 2000) zum Beispiel auch in Reis (Hoa *et al.*, 2002).

Nach der Exzision verbleibt das Rekombinasegen zunächst in der Pflanze oder wird in den nächsten Generationen segregieren. Neuerliche Ansätze zielen darauf ab, die Rekombinase entweder sofort zu eliminieren oder das Gen transient zu exprimieren.

### 2.2.2 Das Rekombinationssystem Flp/FRT

Das eukaryotische Rekombinationssystem Flp/FRT (Broach *et al.*, 1982) aus dem 2  $\mu$  Plasmid aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hartley und Donelson, 1980) ist wie das Cre/loxP-System zum sequenz-spezifischen Neuarrangement von DNA befähigt. Die 48 kDa große Rekombinase Flp (*flipping* DNA) bindet und vermittelt gerichtete Veränderungen an den Flp Recognition Targets (FRT, Senecoff *et al.*, 1985). Diese Erkennungssequenzen bestehen aus 13 bp langen *Inverted Repeats* (IR), die einen 8 bp langen asymmetrischen Spacer einschließen (siehe Abb. 1), der die Orientierung der *site* bedingt. Ein von den loxP-sites abweichendes strukturelles Merkmal der Flp-Erkennungssequenz stellt eine zusätzliche, direkt wiederholte 13 bp lange Sequenz dar. Funktionsfähig ist das System jedoch auch nur mit der Minimalausstattung, bestehend aus IR und Spacer (Gronostajski und Sadowski, 1985a). Die Struktur des Spacers spielt eine zentrale Rolle bei der Flp-vermittelten Rekombination. Eine hohe Homologie zwischen beiden Spacer-Regionen erwies sich als essentiell für die Funktionalität des Flp/FRT-Systems (Senecoff und Cox, 1986). Schlüsselmerkmal für eine effektive Reaktion durch die Rekombinase ist eine optimale Biegung der DNA (Chen *et al.*, 1992). Lütke und Sadowski (1998) konnten das zentrale Basenpaar AT im Spacer als Ort der Krümmung identifizieren.

Wie bereits beschrieben, ist auch die Flp-Rekombinase eine Integrase des Tyrosin-Typs (Gronostajski und Sadowski, 1985b; Übersicht: Voziyanov *et al.*, 1999). Tyrosin in der C-terminalen Domäne der Rekombinase initiiert den Strangbruch am Rand des Spacers mit einem 8 bp langen Überhang. Der Überhang der ersten *site* wird kovalent mit dem der zweiten verknüpft.

Den Tyrosin-Rekombinasen ist die Abhängigkeit der Rekombinationsreaktion von der Richtung der Erkennungssequenzen gemein. Entgegengesetzt orientierte *sites* resultieren in der Inversion der von ihnen umgebenden Sequenz; gleichgerichtete Erkennungssequenzen führen innerhalb eines Moleküls zur Eliminierung der zwischenräumlichen DNA, bimolekular kommt es zur Integration FRT-tragender Sequenzen (siehe Abb. 2).

Die natürliche Funktion der Flp-Rekombinase liegt in der Beschleunigung des Replikationsprozesses (Futcher, 1986; Volkert *et al.*, 1996; Volkert und Broach, 1986). Das 2  $\mu$  Plasmid der Hefe liegt in einer hohen Kopienzahl in der Zelle vor. Um diese Kopienzahl aufrecht zu erhalten, hat schon 1986 Futcher ein Modell angenommen, nach dem nach nur einmaliger Initiation der Replikation mehrere Kopien des 2  $\mu$  Plasmids repliziert werden können. Nach Initiation und fortlaufender, bidirektionaler Replikation an den zwei Replikationsgabeln, folgt aus der sequenz-spezifischen Rekombination zwischen der bereits

replizierten und der entfernter gelegenen FRT-*site* die Inversion der dazwischen befindlichen DNA. Dies führt zur Umkehr einer Replikationsgabel, so dass beide nach dem Modell des sog. *double rolling circles* die zirkuläre DNA-Vorlage replizieren.

In anderen Organismen eingesetzt, führt das Flp/FRT-System zuverlässig gerichtete Rekombinationen aus. So konnte Flp-vermittelte Rekombination sowohl in prokaryotischen Systemen (z. B. in *E.coli*: Huang *et al.*, 1991), als auch in eukaryotischen tierischen Systemen (z. B. in *Drosophila*: Golic und Lindquist, 1989; Golic *et al.*, 1997) angewendet werden.

### Anwendung in pflanzlichen Systemen

Auch in pflanzlichen Systemen erwies sich das sequenz-spezifische Rekombinationssystem Flp/FRT als geeignetes Mittel zur gerichteten Veränderung von DNA (zur Übersicht: Lyznik *et al.*, 2003).

In Protoplasten von Mais und Reis konnten Lyznik und Mitarbeiter Flp-vermittelte Exzisionsereignisse nachweisen (Lyznik *et al.*, 1993; 1996). Auch in *Arabidopsis thaliana* (Sonti *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2000) und Tabak (Lloyd und Davis, 1994; Gidoni *et al.*, 2001) konnten rekombinationsbedingte Exzisionen durch die Restauration von detektierbaren Markern aufgezeigt werden.

Die moderne Biotechnologie lanciert die Etablierung von induzierbaren Transgenen. So konnte durch den Einsatz von Hitzeschock-Promotoren in Maisprotoplasten (Lyznik *et al.*, 1995), in stabil transformierten Tabak (Kilby *et al.*, 1995) und in *Arabidopsis thaliana* (Kilby *et al.*, 2000) die Flp-Rekombinase induziert werden. Die durch die Rekombinase bewirkte Exzision konnte durch Expression eines Reportergens nachgewiesen werden und zeugt von der Funktionalität dieses induzierbaren Systems.

## **3 Zielgerichtete Integration**

Die Übertragung von Transgenen und deren Integration im pflanzlichen Genom erfolgt mit den bisher verwendeten Systemen zufällig und nicht zielgerichtet. Nach der Transformation von genetisch identischem Material mit dem gleichen Konstrukt finden sich oft große Unterschiede zwischen den Nachkommen hinsichtlich der Menge des gebildeten Genprodukts und der Stabilität der Expression. Mögliche Ursachen sind Positionseffekte (Meyer, 2000), die Kopienzahl der eingeführten Transgene (Muskens *et al.*, 2000; Matzke *et*

---

*al.*, 2002) oder somaklonale Variationen (Kaepler *et al.*, 2000). Durch gerichtete Integration von Transgenen können Positionseffekte zur gezielten Expression eines Transgens genutzt werden.

Eine Möglichkeit zur gerichteten Integration von Transgenen ist die homologe Rekombination (HR). In Hefen und tierischen Zellen ist die HR eine gängige Methode, um Gene gezielt ins Genom einzuführen (Übersicht: Puchta und Meyer, 1994).

Eine effiziente Transgenintegration durch homologe Rekombination in pflanzlichen Systemen konnten bislang nur im haploiden Moos *Physcomitrella patens* erreicht werden (Schäfer und Zryd, 1997; zur Übersicht: Schäfer, 2002; Hohe und Reski, 2003). Wenngleich eine gerichtete Integration von DNA-Sequenzen durch HR auch in Tabakprotoplasten (Offringa *et al.*, 1990), Tabak (Kovalchuk *et al.*, 2003) oder *Lotus japonicus* (Thykjaer *et al.*, 1997) gelang, so sind die Integrationsraten in höheren Pflanzen verglichen mit anderen Organismen sehr niedrig.

Die Integrationshäufigkeit in Pflanzen ließe sich durch induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) steigern, die homologe Rekombinationsereignisse lancieren. Solche DSB können z. B. durch Endonukleasen hervorgerufen werden. Zur Analyse von DSB-induzierten Rekombinationsvorgängen wird oft eine Endonuklease aus Hefemitochondrien (I-SceI) eingesetzt, die eine statistisch sehr selten vorkommende 18mer Sequenz erkennt (Perrin *et al.*, 1993). Zunächst wird eine Schnittstelle für I-SceI ins Zielgenom integriert. Eine transient exprimierte Endonuklease erzeugt dann den spezifischen DSB. Der geöffnete DNA-Strang stellt ein begünstigtes Substrat für HR dar; in Anwesenheit von homologen Sequenzen, die mit einem Zielgen verbunden sind, kommt es zur gerichteten Integration am DSB.

Ursprünglich für Untersuchungen in Hefe entwickelt (Plessis *et al.*, 1992), konnten Puchta und Mitarbeiter auch in pflanzlichen Systemen zeigen, dass durch I-SceI-vermittelte DSB die Rekombinationshäufigkeit erhöht werden konnte (in Tabakprotoplasten: Puchta *et al.*, 1993; in Tabak: Puchta *et al.*, 1996; Puchta, 1999).

Für die Anwendung in pflanzlichen Systemen sind diese Methoden nicht wirkungsvoll genug, um die Produktion von „maßgeschneiderten“ transgenen Pflanzen erheblich zu vereinfachen. Eine vielversprechende, effizientere Möglichkeit bietet die sequenz-spezifische Integration durch gleichnamige Rekombinationssysteme. Diese Werkzeuge erlauben den gerichteten Einbau von Transgenen in Hefen (R/RS: Matsuzaki *et al.*, 1990) und tierischen Zellen (Flp/FRT in *Drosophila*: Kosolaki *et al.*, 1992; Golic *et al.*, 1997; Flp/FRT in Säugerzellen: Ellaiah *et al.*, 2003; Cre/loxP in Säugerzellen: Fukushige und Sauer, 1992; Soukharev *et al.*, 1999).

In pflanzlichen Zellen bietet nachweislich das sequenz-spezifische Cre/loxP-System die Möglichkeit der gerichteten Integration von Transgenen. Nach Etablierung einer einzelnen loxP-*site* im Zielgenom, kann durch Cre-vermittelte Rekombination die Integration von loxP-tragenden Transgenen genau an der *site* im Zielgenom stattfinden.

Schon früh zeigten Dale und Ow (1990) Integrationsereignisse in transienten Tests mit Tabakprotoplasten. Auch Albert *et al.* (1995) und Day *et al.* (2000) konnten in Protoplasten von Tabak gezielte Integrationsereignisse durch das Cre/loxP-System realisieren.

*In planta* konnten *site*-spezifische Integrationen am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden (Vergunst und Hooykaas, 1998; Vergunst *et al.*, 1998, 2000a). In loxP-tragenden Pflanzen, die das *cre*-Rekombinasegen exprimieren, konnte durch Agrobakterien-vermittelte Re-Transformation das Kanamycinresistenzgen mit einer loxP-Sequenz sequenz-spezifisch integriert werden.

Auch in monokotylen Pflanzen kann das Cre/loxP-System zur gerichteten Integration genutzt werden. Während der Entstehung dieser Arbeit entwickelten Srivastava und Mitarbeiter eine effiziente Methode zur sequenz-spezifischen Integration von Transgenen in Reis. Nach Agrobakterien-vermittelter Einführung einer einzelnen loxP-Sequenz in das Reisgenom, wurden Kalli mit einem Reportergen, das eine loxP-*site* trägt, biolistisch transformiert. Aus positiven Kalli entwickelten sich Pflanzen, in denen *site*-spezifische Integration nachgewiesen werden konnten (Srivastava *et al.*, 2004).

#### **4 Ziel dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT auf ihre Eignung in transgenem Mais zu untersuchen.

Dazu sollten im ersten Schritt *in vitro*-Tests und transiente Analysen in Weizenembryonen durchgeführt werden, um die Fähigkeit der Rekombinationssysteme in monokotylen Pflanzenzellen zu prüfen. Nach erfolgreichem Abschluss sollten transgene Maispflanzen mit den Rekombinase- bzw. den Rekombinaseerkennungsequenzen hergestellt werden. *In planta* wurde ein Selektionsmarkergen integriert, das von zwei gleichgerichteten Erkennungssequenzen flankiert wurde. Kreuzungen mit Maispflanzen, die die korrespondierende Rekombinase konstitutiv exprimieren, sollten zur sequenz-spezifischen Exzision des flankierten Markergens führen. Diese Nachfahren bilden die erste Grundlage für weiterführende Experimente zur gerichteten Integration von Transgenen.

**C Material und Methoden**

## 1 Chemikalien, Enzyme, sonstige Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „reinst“ bei den folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt, D), Biomol (Hamburg, D), Bio-Rad (München, D), Brand (Wertheim/Main, D), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, D), Roche Diagnostics (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

Die verwendeten Enzyme, DNA- und RNA-Längenstandards stammen von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot, D), Invitrogen (Carlsbad, USA), Roche Diagnostic (Mannheim, D) und Clontech (San Jose, USA).

Alle Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, USA) hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min, 120°C,  $2 \times 10^5$  Pa) oder sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, Dassel, D; Porendurchmesser 0,45 µm).

Es wurden Nylonmembranen von Amersham Biosciences Europe (Freiburg, D), Blotting Papier von Schleicher und Schüll (Dassel, D) und Filmmaterial der Firmen Mitsubishi (Kyoto, Japan), Eastman Kodak (Rochester, USA) und Amersham Biosciences Europe (Freiburg, D) verwendet.

## 2 Bakterien, Pflanzenspezies und Anzuchtbedingungen

### 2.1 *Escherichia coli*

Für die Klonierung der Transformationsvektoren wurden die *E.coli*-Stämme DH5α-T1<sup>R</sup> (Hanahan, 1983) und XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Die Bakterien wurden bei 37°C auf LB-Medium kultiviert (Miller, 1972). Die Selektion transformierter Stämme erfolgte entsprechend dem Selektionsmarker β-Laktamase mit 100 µg/ml Ampicillin.

### 2.2 Mais (*Zea mays* L.)

Folgende zwei Genotypen wurden während der Arbeit verwendet:

A188 (Green und Philips, 1975) und

H99 (D'Halluin *et al.*, 1992).

Die Kultivierung erfolgte im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen (25°C/20°C-Tag/Nacht), 16 h Licht und einer Lichtsumme von 650 klxh/d. Bestäubungen wurden manuell vorgenommen. Um unerwünschte Fertilisationen zu vermeiden, wurden die Kolben vor dem Erscheinen der Narben bedeckt.

### 2.3 Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Die Vernalisation der Weizenkeimlinge (Winterweizen, Genotyp ‚Florida‘) erfolgte acht Wochen unter Langtag-Bedingungen (4°C/2°C-Tag/Nacht), 16 h Licht und 20-25 klx. Die Pflanzen wurden anschließend im Gewächshaus bei 18°C/13°C (Tag/Nacht), 16 h Licht (28 klx, maximale Lichtsumme 500 klxh/d) angezogen.

## 3 Plasmide

pUbi.gus (K. Oldach, Universität Hamburg, unveröffentlicht)

Dieser auf dem pUC19 (Vieira und Messing, 1982) basierende Vektor (6,3 kbp) enthält den konstitutiven Ubiquitin1-Promotor (Ubi1-Promotor) aus *Zea mays* (Christensen *et al.*, 1992), das  $\beta$ -Glukuronidasegen *uidA* (*gus*) aus *E.coli* (Jefferson, 1986), und den Terminator des Nopalinsynthasegens (nos-Terminator) aus *Agrobacterium tumefaciens* (Dhaese *et al.*, 1983).

pMM23 (Dale und Ow, 1990; bereitgestellt von Dr. Schiemann, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig)

Auf dem Vektor pUC120 basierend enthält pMM23 (6 kbp) das *cre*-Rekombinasegen des Bakteriophagen P1 (Sternberg *et al.*, 1986) unter der Kontrolle des 35S-Promotors des *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) und den nos-Terminator.

pUbi.cas (D. Becker, Universität Hamburg, unveröffentlicht)

Dieser Vektor (4,5 kbp) enthält eine Klonierungskassette bestehend aus dem Ubi1-Promotor und dem nos-Terminator. Zwischen Promotor und Terminator befindet sich die multiple Klonierungsstelle aus pUC19.

pAct1.cas (McElroy *et al.*, 1990)

Aus dem Klonierungsvektor pSP72 hervorgegangen, enthält pAct1.cas (4,8 kbp) den Actin1-Promotor (Act1) aus Reis und das Act1-Intron aus *Oryza japonica* sowie den nos-Terminator.

p35SAcS (Eckes *et al.*, 1989)

Dieser auf pUC18 basierende Vektor (4 kbp) enthält den *CaMV* 35S-Promotor, das synthetische *pat*-Gen, abgeleitet aus *Streptomyces viridochromogenes*, welches für die Phosphinothricin-*N*-Acetyltransferase kodiert, und den *CaMV* 35S-Terminator.

pCal.gus (C. Warren, Universität Stanford, USA, persönliche Mitteilung)

Dieser aus dem Klonierungsvektor pUC19 hervorgegangene Vektor (6,1 kbp) trägt den 35S-Promotor, das erste Intron des Alkohol Dehydrogenase Gens aus Mais sowie das *gus*-Gen und den nos-Terminator.

#### 4 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide (Tab. 1), hergestellt bei den Firmen biomers.net (Ulm, D), Invitrogen (Karlsruhe, D) oder Sigma-Ark (Darmstadt, D), wurden für die Klonierungen, Sequenzierungen, Amplifizierung von Genfragmenten und für die Markierung von DNA-Sonden verwendet.

**Tabelle 1:** Übersicht über verwendete Oligonukleotide und deren Funktion.

	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Funktion
Oligonukleotide für Klonierungen	FLP1	atagctggatccagatcggcgct aagcatg	Amplifikation der kompletten Kodierregion des <i>flp</i> -Rekombinasegens aus Hefe
	FLP2	aggtagcaggatccgaacggcata gtgctgttta	
	lox 2 rv	cccgggatccataacttcgtat aatgtatgctatacgaagtatt ctagagtcgacctgcagaagtaa caccaaac	Klonierung der Vektoren mit Rekombinationsstellen
	lox 4 rv	tagtacgaattcataacttcgta taatgtatgctatacgaagtatt ccgatctagtaacatagatgaca ccgcgc	
	P1	tccgggtccatggtagggccc	
	P3	ggtagcagctcgaatttccccg atcgttcaaacatttggc	
	FRT 2 rv	ccgggatccgaagttcctatac tttctagagaataggaacttctc tagagtcgacctgcagaagtaac accaaac	
	FRT 4 rv	tagtacgaattcgaagttcctat actttctagagaataggaacttc ccgatctagtaacatagatgaca ccgcgc	

Tabelle 1: Fortsetzung.

Amplifizierung von Genfragmenten	UbiFor	atgccagcctgttaaagccc	bindet an Position 588>607 im Ubiquitin1-Promotor*
	Ubi14	cgatgctcaccctgttgtttgg	bindet an Position 1483>1504 im Ubiquitin1-Promotor*
	18-rev-75	cttcggctcgtatgttgtgtgg	bindet an Position 75<98 stromabwärts der <i>EcoRI-site</i> der pUC-Sequenz von pUbi.cas-Derivaten
	cre1	gacatgtccaatttactgaccg	Amplifikation der kompletten Kodierregion des <i>cre</i> -Rekombinasegens
	cre2	cttactaatcgccatcttccag	
Markierung von DIG-Sonden	pat3	agctacagcagctgatatggc	bindet an Position 36>56 im <i>pat</i> -Gen
	pat4	ggaggagctggcaactcaaaa	bindet an Position 501<521 im <i>pat</i> -Gen, amplifiziert mit pat3 ein 486 bp langes Fragment des synthetischen <i>pat</i> -Gens
	cre_fw	caccagccagctatcaactc	bindet an Position 775<756 im <i>cre</i> -Gen, amplifiziert mit cre2 ein 281 bp langes Fragment des <i>cre</i> -Rekombinasegens
	FLP782fw	ggaccggcaattcttcaagc	bindet an Position 782>801 im <i>flp</i> -Gen
	FLP1000rv	gcttatcgctccaatttcccac	bindet an Position 979<1000 im <i>flp</i> -Gen, amplifiziert mit FLP782fw ein 218 bp langes Fragment des <i>flp</i> -Rekombinasegens
Sequenzierung	Ubi31	ggcatatgcagcagctatatg	bindet an Position 1403>1423 im Ubiquitin1-Promotor*
	18-1	gcgcgcttgccgattcatta	bindet an Position 201<221 stromabwärts der <i>EcoRI-site</i> der pUC-Sequenz von pUbi.cas-Derivaten
	GUS1_3	ctgcccacctttcgggtataaag acttcgc	bindet an Position 212<241 im <i>gus</i> -Gen

\* *HindIII*-Schnittstelle des pUC-Vektors stellt Position 1 dar.

## 5 Antikörper

*anti-Cre* (Novagen, San Diego, USA)

polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Cre-Rekombinase

*anti-rabbit* (Sigma, Saint Louis, USA)

monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG ( $\gamma$ -Kette)

Peroxidase Konjugat

## 6 Molekularbiologische Methoden

### 6.1 Transformation von monokotylen Gewebe

Als Explantate für die Transformation von Mais wurden unreife zygotische Embryonen, hervorgegangen aus der Kreuzung des Genotyps A188 mit H99, eingesetzt. Die Isolierung der Embryonen aus oberflächensterilisierten Maiskörnern erfolgte 10-11 Tage nach Bestäubung für eine stabile Transformation; 2-3 Wochen nach Bestäubung für transiente Expressionsanalysen.

Zur stabilen Transformation nach Brettschneider *et al.* (1997) wurden die Embryonen eine Woche auf N6<sup>+</sup>-Medium (D'Halluin *et al.*, 1992) vorkultiviert. Eine osmotische Vorbehandlung auf modifiziertem N6<sup>+</sup>-Medium mit einer höheren Osmolarität (1,1 Os) als das Basismedium wurde für 4 h vor und 2-19 h nach Transformation vorgenommen. Als Träger der zu transformierenden DNA dienten Goldpartikel eines Durchmessers von 0,4-0,8 µm (Heraeus, Hanau, D). Die Fällung der DNA wurde durchgeführt, wie bei Becker *et al.* (1994) beschrieben, ebenso die biolistische Transformation mit einem Druck von 1350 psi mithilfe der Partikelkanone PDS 1000/He der Firma Bio-Rad (München, D). Pro Beschuss wurden 29 µg Goldpartikel eingesetzt, an denen 29 ng DNA präzipitiert waren.

Als Selektionsmarker wurde das *pat*-Gen des Vektors p35SAcS übertragen, das eine Resistenz gegen den im Herbizid Basta<sup>®</sup> (Bayer CropScience, Monheim, D) enthaltenen Wirkstoff Phosphinothricin vermittelt. Die Selektion von transgenem Gewebe erfolgte nach 2-wöchiger Kallusproliferation für zwei Wochen auf kallusinduzierendem N6<sup>+</sup>-Medium und für 2 bis 3 Wochen auf MS-Regenerationsmedium (Murashige und Skoog, 1962) mit jeweils 2 mg/l Basta<sup>®</sup>. Sprosse wurden zur Bewurzelung auf hormonfreiem MS-Medium kultiviert, regenerierte Pflanzen in Erde transferiert und durch einen anschließenden Sprühtest mit einer 250 mg/ml Basta<sup>®</sup>-Lösung selektiert.

Zum vorzeitigen Auskeimen von drei bis vier Wochen alten Maisembryonen wurde der Maisembryo nach Oberflächensterilisation des Korns auf halbkonzentriertem MS-Medium in Magentadosen kultiviert. Nach zwei Wochen konnten die etwa 10 cm hohen Keimlinge in Erde transferiert werden.

Für transiente Expressionsanalysen wurden Maisembryonen 17 Tage nach Bestäubung auf osmotischem N6<sup>+</sup>-Medium biolistisch transformiert (abweichend mit 83 µg Goldpartikeln und 167 ng DNA).

Die Transformation von Skutellumgewebe von Weizenembryonen wurde ebenfalls für transiente Expressionsanalysen durchgeführt. Unreife Weizenembryonen wurden steril isoliert und nach Becker *et al.* (1994) mit einem Druck von 1350 psi biolistisch transformiert (abweichend mit 58 µg Goldpartikeln und 58 ng DNA) und kultiviert.

## 6.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA

### 6.2.1 Standardmethoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wie die Isolierung von Plasmid-DNA und Klonierungen, Restriktionen, Aufreinigungen, Fällungen und Quantifikationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Bei der Verwendung von modifizierenden Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Angaben der Hersteller verfahren.

Sequenzierungen wurden von der Firma DNA-Cloning-Service (Hamburg, D) durchgeführt.

### 6.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Durchführung von PCR-Reaktionen orientierte sich an den Herstellerangaben.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich aus 1x Puffer, 0,1 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,5 µM Primer, 2 % DMSO und 1 U/50 µl *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase zusammen. Die Templatemenge betrug 10 ng für Plasmid-DNA und 500 ng für genomische DNA. Die Reaktion wurde im Thermocycler von Biometra (mit oder ohne Gradientenfunktion, Göttingen, D) durchgeführt. Das Temperatur/Zeit-Protokoll lautete wie folgt: 2 min Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen, beginnend mit 30 sec bei 94°C, 30 sec spezifische Annealing-Temperatur (durch Temperaturgradienten-PCR festgestellt), 1 min (*Taq*) oder 2 min (*Pfu*) pro kbp Amplifikat bei 72°C, finale Elongation 7 min bei 72°C und Reaktionsstopp bei 4°C.

### 6.2.3 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA

Für Southern Blot- und PCR-Analysen wurde genomische Pflanzen-DNA aus Blattmaterial gewonnen. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Schwingmühle (Retsch MM2000, Haan, D) aufgeschlossen. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde ein modifiziertes Protokoll von Pallotta *et al.* (2000) verwendet. 200 mg Pflanzenmaterial wurden mit 800 µl Extraktionspuffer behandelt und mit der gleichen

Menge eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) extrahiert. Nach Fällung der DNA wurde das Pellet in TE-Puffer mit 40 µg RNaseA/ml aufgenommen.

#### 6.2.4 Markierung von DNA

##### DIG-Markierung mittels PCR

Für die molekulare Analyse der transformierten Pflanzen wurde Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) zur Markierung von DNA-Sonden durch PCR verwendet.

Ein PCR-Reaktionsansatz bestand aus je 0,6 µM Primer; je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,13 mM dTTP; 0,035 nM DIG-dUTP; 1x PCR-Puffer (mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 4 U *Taq*-Polymerase/100 µl Reaktionsansatz und 1 ng Template-DNA/100 µl Reaktionsansatz.

Die Temperatur-Zeitprofile der PCR wurden entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer und der Länge des Amplifikates gewählt.

##### Radioaktive Markierung

Die radioaktiven Sonden wurden mit einem DecaLabel™ oder HexaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas, St. Leon Rot, D) entsprechend der Herstellerangaben random primed mit [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP markiert. Über MicroSpin™ S-300 HR *Columns* (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, D) wurden die nicht eingebauten Nukleotide abgetrennt.

#### 6.2.5 Southern Blot-Analyse

Der Nachweis der Transgene in den Maispflanzen erfolgte durch Southern Blot-Analysen der genomischen DNA (Southern, 1975). Es wurden 20 oder 25 µg restringierte DNA in 0,8 % Agarose elektrophoretisch getrennt, depurinieren und durch Kapillartransfer mit 10x SSC auf Hybond NX-Nylonmembran gebロットet.

Für die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit DIG-dUTP-markierten DNA-Sonden wurde der Fertigpuffer DIG Easy Hyb von Roche Diagnostics (Mannheim, D) verwendet. Die Hybridisierung und die anschließende chemilumineszente Detektion mit CSPD (Disodium 3-(4-methoxy-1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan)-4-yl)phenyl phosphate; Roche Diagnostics, Mannheim, D) erfolgte entsprechend dem *DIG Application Manual for Filter Hybridization*. Die Expositionzeiten waren abhängig von der Sensitivität der verwendeten Sonden und der Signalstärke auf den Blots und variierten zwischen 3 und 16 h.

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

### **6.3 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA**

#### 6.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt RNA aus Blättern von Mais erfolgte mithilfe der peqGOLD TriFast™-Lösung der Firma peqLab (Erlangen, D) entsprechend den Herstellerangaben.

#### 6.3.2 Northern Blot-Analyse

In einem denaturierendem MOPS-Formaldehydgel (Sambrook *et al.*, 1989) wurden 15 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Die RNA wurde während des Kapillar-Blots mit 10x SSC auf Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembranen transferiert.

Für die Prä- bzw. Hybridisierung wurde Church-Puffer verwendet. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Filter wurden 10-15 min bei 65°C in folgenden Lösungen gewaschen: zweimal mit 1x SSC; 0,1 % SDS und einmal mit 0,5x SSC; 0,1 % SDS. Die Expositionen erfolgten zunächst 20 h auf *Imaging Plates* und anschließend 2 bis 4 Wochen auf Röntgenfilme.

### **6.4 Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen**

#### 6.4.1 Isolierung von Gesamtproteinen

300 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und Proteine mit 300 µl Puffer (125 mM Tris, pH 6,8; 10 % SDS; 25 % Glycerol; 12,5 % β-Mercaptoethanol) extrahiert. Nach Zentrifugation und 5minütigem Kochen wurden 25 µl des Überstandes direkt für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1979) eingesetzt.

### 6.4.2 Western Blot-Analyse

Der Größe der Cre-Rekombinase entsprechend wurde ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1979) verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden nach der *Semi-Dry-Blotting*-Methode in der Elektro Blot-Kammer von Bio-Rad (München, D) nach Herstellerangaben auf eine Hybond-ECL-Membran übertragen. Nach Kontrolle des Transfers durch Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung konnte diese zur immunologischen Detektion eingesetzt werden. Die Blockierung erfolgte 1 bis 15 h mit 5 % Magermilchpulver (Marke Saliter, Obergünzburg, D) in TBS mit 0,1 % Tween 20 bei 4°C. Nach 2stündiger Inkubation der Membran mit 1:1000 verdünntem Cre-Antikörper und 3maligem Waschen mit TBS mit 0,1 % Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, einem 1:1000 verdünnten *anti-rabbit*-Peroxidase-Konjugat, und 5maliges Waschen mit TBS. Als Detektionssystem wurde das SuperSignal®-System der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Das Substratgemisch wurde 3 min auf der Membran inkubiert. Die Expositionszeit betrug 2 bis 16 h.

## 7 Histochemischer GUS-Test

Die durch das *gus*-Reportergen vermittelte  $\beta$ -Glukuronidase Aktivität wurde mittels eines histochemischen GUS-Tests nachgewiesen (modifiziert nach Jefferson *et al.*, 1987). Die transformierten Explantate wurden in einem Färbepuffer [100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0); 10 mM EDTA (pH 7,0); 0,5 % Triton X-100; 100  $\mu$ g Chloramphenicol/ml], welcher in einer Konzentration von 1,5 mM das Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronsäure) enthält, für 15 h bei 37°C inkubiert.

Die blau gefärbten Signale wurden mithilfe eines Binokulars ausgewertet.

In einem Puffer, zusammengesetzt aus 33 Glyzerin; 10 mM EDTA und 50 M Tris (pH 7,0), konnten die Explantate bei 4°C gelagert werden.

**D Ergebnisse**

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Rekombinationssystems in Mais zur gerichteten Exzision und Integration von DNA.

Im Rahmen der Arbeit wurde mit zwei Rekombinationssystemen gearbeitet: Cre/loxP aus dem Bakteriophagen P1 und Flp/FRT aus Hefe. Für diesen Zweck wurden Konstrukte mit Rekombinase-Erkennungsstellen (loxP und FRT) und Rekombinasen- (*cre* und *flp*) tragende Vektoren kloniert. In transienten Tests wurden beide Systeme auf ihre Funktionalität untersucht. Anschließend erfolgte die stabile Transformation von Mais. Durch Kreuzung einer Rekombinase-tragenden Pflanze mit einer Pflanze, die einen von den Rekombinase-Erkennungssequenzen flankierten Selektionsmarker trug, wurden beide Bestandteile der Rekombinationssysteme miteinander kombiniert. Die Analyse der Nachkommen sollte den Nachweis der Rekombinationen erbringen.

## 1 Klonierung der Transformationsvektoren

### 1.1 Klonierung des Vektors pUbi::*cre*

Zur Konstruktion des Vektors pUbi::*cre* (Abb. 3) zur konstitutiven Expression der *cre*-Rekombinase im monokotylen Mais unter der Kontrolle des Ubi1-Promotors aus Mais wurde der 35S-Promotor im Plasmid pMM23 (Dale und Ow, 1990) gegen den Ubi1-Promotor aus dem Plasmid pUbi.cas ausgetauscht. Durch Restriktion von pUbi.cas mit *HindIII/PstI* konnte der Ubi1-Promotor isoliert und in den ebenso restringierten und dephosphorylierten Vektor pMM23 kloniert werden.

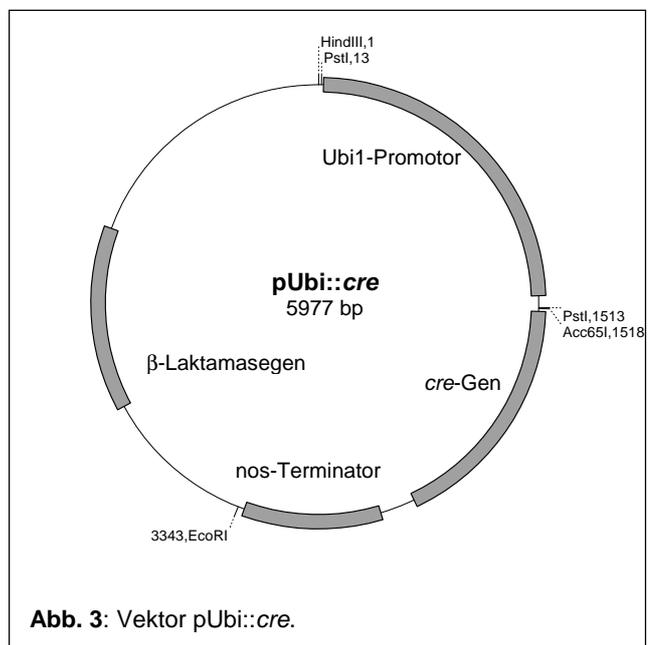
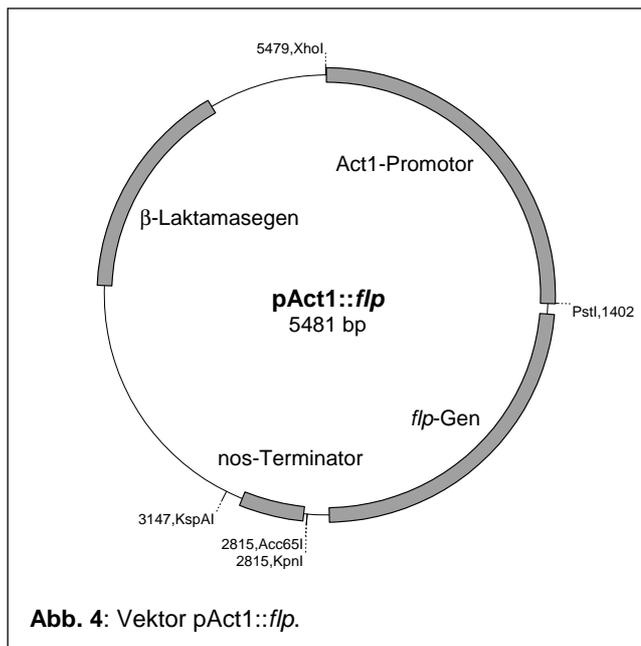


Abb. 3: Vektor pUbi::*cre*.

### 1.2 Klonierung des Vektors pAct1::*flp*

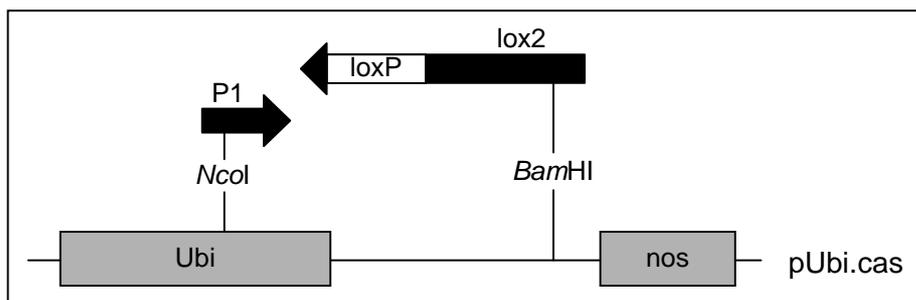
Das 1,2 kb große *flp*-Rekombinasegen wurde aus handelsüblicher Frischhefe amplifiziert. Die Primer wurden aus der Sequenz des *flp*-Rekombinasegens aus dem 2  $\mu$  Plasmid aus *Saccharomyces cerevisiae* abgeleitet (NCBI Genbank, Zugangsnummer NC 001398).

Das PCR-Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pZero Blunt® TOPO® (Invitrogen) kloniert und Sequenz sowie Orientierung des *flp*-Gens durch Restriktion überprüft. Das *flp*-Fragment aus dem Klonierungsvektor zur konstitutiven Expression unter der Kontrolle des Act1-Promotors wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *PstI/KpnI* herausgeschnitten und in den ebenso restringierten und dephosphorylierten Vektor pAct1.cas kloniert (Abb. 4).



### 1.3 Klonierung der Vektoren pUbi.2lox.pat und pUbi.2FRT.pat

Die zwei gleichgerichteten Rekombinationserkennungsstellen loxP und FRT wurden mittels PCR in das Ausgangsplasmid pUbi.cas eingefügt. Exemplarisch wird im folgenden die Klonierung des von loxP-Sequenzen flankierten Selektionsmarkers *pat* beschrieben. Der gleichen Strategie folgte die Klonierung des Transformationsvektors pUbi.2FRT.pat.



**Abb. 5:** Klonierungsschema zur Einführung einer loxP-Sequenz in den Vektor pUbi.cas.

Mit dem Primerpaar P1 und lox2 wurde ein 490 bp langes loxP-Fragment mit den Restriktionsstellen *NcoI* und *BamHI* amplifiziert und in den Vektor pUbi.cas kloniert.

Mit dem Primerpaar P1 und lox2 wurde auf der Basis des Templates pUbi.cas ein 490 bp langes loxP-Fragment amplifiziert (Abb. 5). P1 enthält Sequenzen aus dem

Ubi1-Promotor und damit eine im Vektor singular vorkommende *NcoI*-Schnittstelle. Der Primer lox2 trägt neben der 34 bp langen loxP-site Sequenzen der Multiklonierungsstelle. Entscheidend für die weitere Klonierung ist darin die einmalig im Vektor vorhandene Schnittstelle für *BamHI*. Das loxP-Fragment wurde mit *NcoI/BamHI* verdaut und in den ebenso restringierten und dephosphorylierten Vektor pUbi.cas kloniert.

Der so entstandene Vektor pUbi.lox.nos (Abb. 6) enthält den Ubi1-Promotor, eine loxP-site sowie den nos-Terminator. pUbi.lox.nos wurde sowohl als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen verwendet als auch in *in vitro* Rekombinations- und transienten Expressionsanalysen eingesetzt (siehe Ergebnisse Kapitel 2 und 3).

Die zweite loxP-Sequenz wurde ebenfalls mittels PCR in den Vektor pUbi.lox.nos integriert. Mit dem Primerpaar P3 und lox4

wurde ein weiteres loxP-Fragment amplifiziert (Abb. 7). Der Primer P3 beinhaltet Sequenzen der Multiklonierungsstelle aus dem ursprünglichen Vektor pUbi.cas und damit auch die im Vektor einmalig auftretende Schnittstelle für *SstI*; lox4 trägt die loxP-Sequenz und die singular im Vektor vorkommende *EcoRI*-Schnittstelle.

Als Template wurde der Vektor pUbi.lox.nos eingesetzt. Das 350 bp lange loxP-Fragment wurde nach *SstI/EcoRI*-Verdau in den ebenso restringierten und dephosphorylierten Vektor pUbi.lox.nos kloniert.

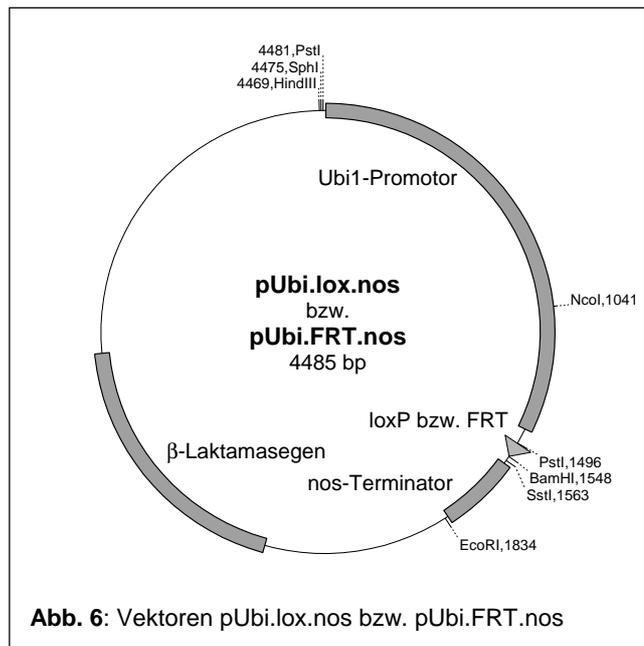


Abb. 6: Vektoren pUbi.lox.nos bzw. pUbi.FRT.nos

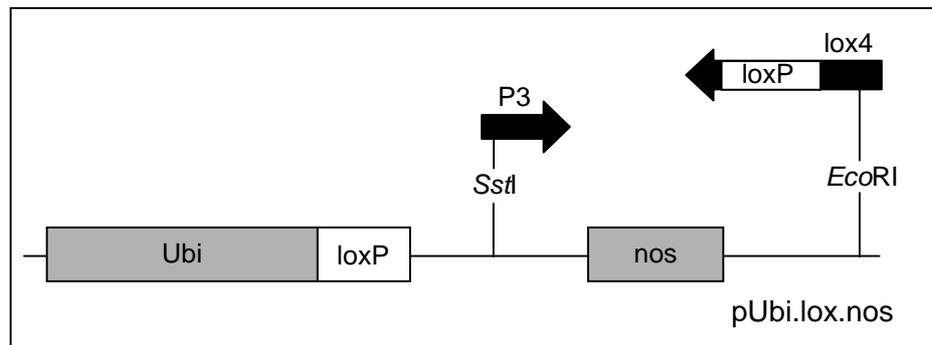
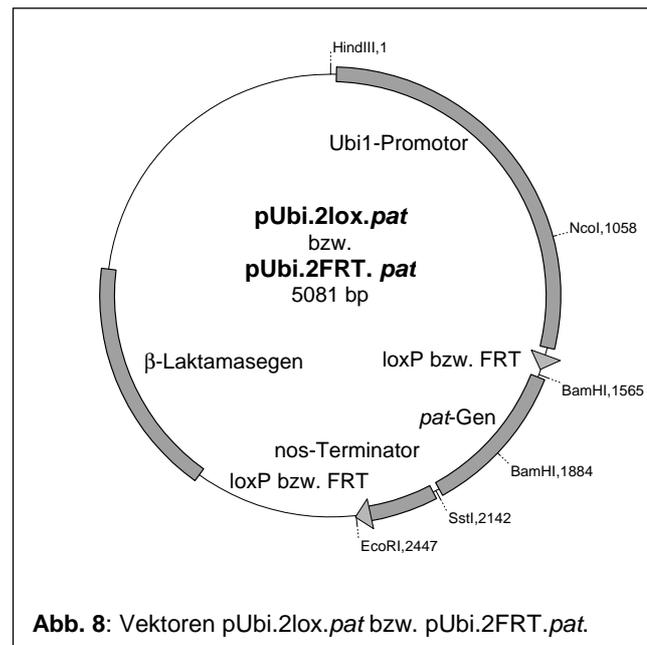


Abb. 7: Klonierungsschema zur Einfügen der zweiten loxP-Sequenz in den Vektor pUbi.lox.nos.

Mit dem Primerpaar P3 und lox4 wurde ein weiteres loxP-Fragment amplifiziert. Dieses 350 bp lange loxP-Fragment mit *SstI*- und *EcoRI*-sites wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pUbi.lox.nos kloniert.

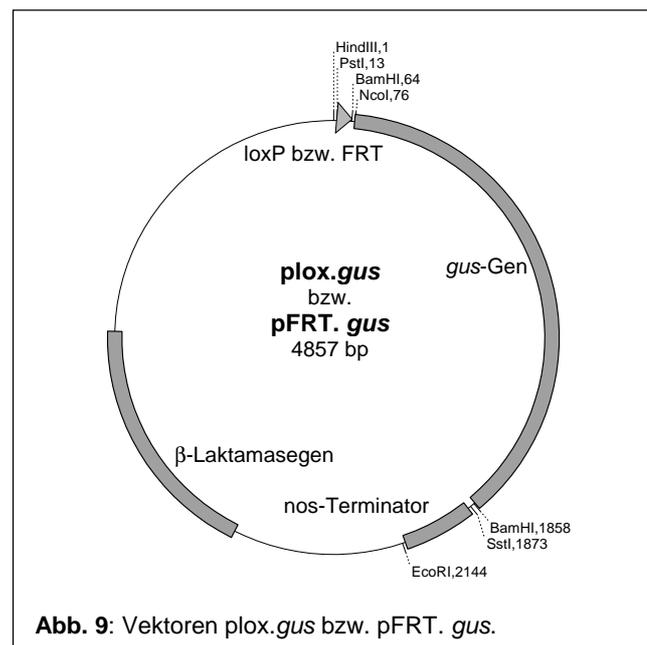
In den so entstandenen Vektor pUbi.2lox.nos wurde zwischen der 5' loxP-Sequenz und dem nos-Terminator das Selektionsmarker-gen *pat* kloniert. Dazu wurde der Vektor p35SAcS *SalI*-verdaut. Die überhängenden Enden der gewonnenen, 550 bp langen *pat*-Sequenz wurde durch die 5'→3'-Polymeraseaktivität des großen Fragments der DNA Polymerase I (*Klenow*-Enzym) aufgefüllt und in den *SmaI*-verdauten Vektor pUbi.2lox.nos kloniert. Die Orientierung des *pat*-Gens wurde durch Restriktion überprüft.

Die auf diese Weise erhaltenen Vektoren pUbi.2lox.pat und pUbi.2FRT.pat (Abb. 8) wurden für stabile Transformationen von Mais und vorangehende transiente Analysen eingesetzt (siehe Ergebnisse Kapitel 2, 3 und 4).



#### 1.4 Klonierung der Vektoren plox.gus bzw. pFRT.gus

Um Rekombinationsereignisse sichtbar machen zu können, wurde ein promotorloses Reportergen mit einer einzelnen Rekombinationserkennungsstelle fertiggestellt. Das durch Restriktion mit *Bam*HI aus dem Vektor pCal.gus gewonnene *gus*-Fragment wurde in die ebenfalls *Bam*HI-verdauten und dephosphorylierten Vektoren pUbi.lox.nos und pUbi.FRT.nos (siehe Abb. 6) kloniert. Die Entfernung des Promotors erfolgte durch Restriktion mit *Pst*I und nachfolgender Religation des Plasmids. Die so entstandenen Konstrukte plox.gus und pFRT.gus (Abb. 9) wurden für transiente Expressionsanalysen verwendet.



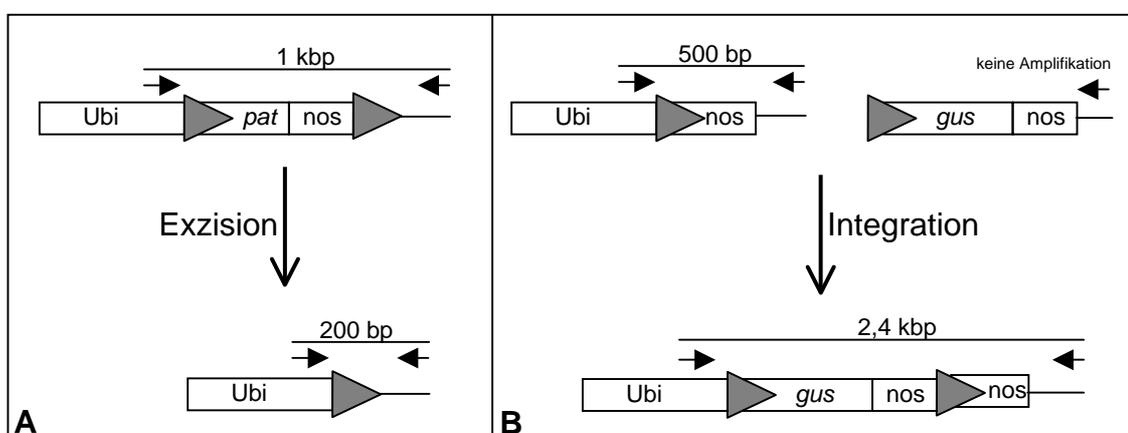
## 2 *In vitro*-Rekombination

Nach der Klonierung der Vektoren mit loxP-Sequenzen wurden diese auf ihre Funktionalität überprüft. Dazu wurde ein *in vitro*-Rekombinationsansatz entwickelt.

Rekombinationsereignisse wie Exzision und Integration von DNA mit loxP-Sequenzen sollten *in vitro* mithilfe einer Cre-Rekombinase (clontech) nachgewiesen werden und mittels PCR aufgezeigt werden. Dazu wurden Primer, die stromabwärts im Ubiquitin1-Promotor (Ubi1466) bzw. stromaufwärts (18-rev-75) von den Rekombinationserkennungsstellen hybridisieren, eingesetzt (Abb. 10). Anhand der unterschiedlich langen PCR-Produkte sollten die Rekombinationsereignisse Exzision (Abb. 10 A) und Integration (Abb. 10 B) dargestellt werden.

Kommt es aufgrund von Cre-vermittelter Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen innerhalb eines DNA-Moleküls zur Exzision der dazwischen liegenden DNA, wäre das PCR-Fragment im Vergleich zur nicht-rekombinierten DNA verkürzt (Abb. 10 A).

Integration eines loxP-Fragments durch intermolekulare Rekombination führt zur Verlängerung des Amplifikates (Abb. 10 B). Da alle Rekombinationsreaktionen reversibel verlaufen, sind verschiedene Fragmentlängen zu erwarten.



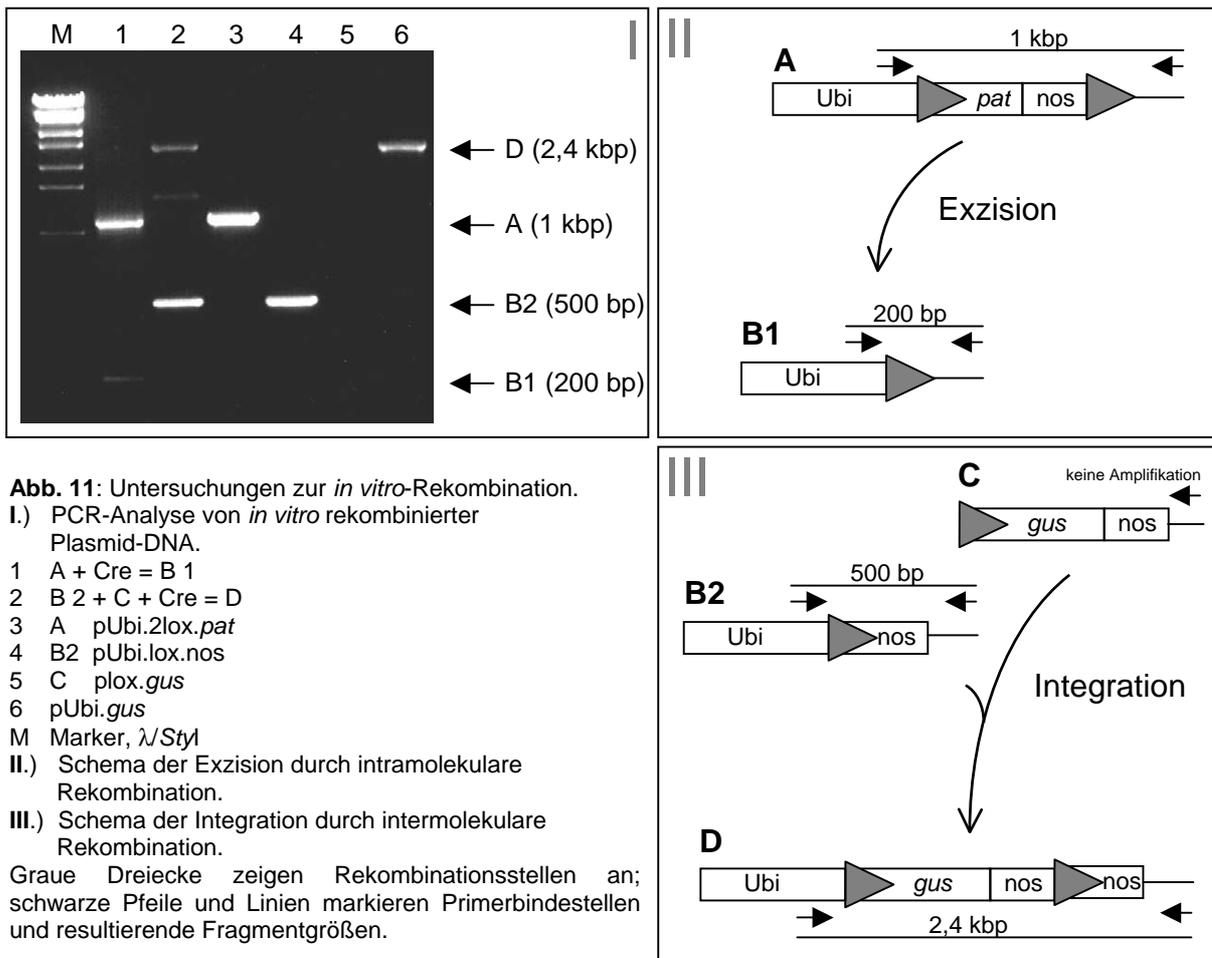
**Abb. 10.** Schema der Rekombinationsereignisse von loxP-tragenden Plasmiden.

**A)** Exzision durch intramolekulare Rekombination.

**B)** Integration durch intermolekulare Rekombination.

Graue Dreiecke zeigen loxP-Sequenzen an; schwarze Pfeile und Linien markieren Primerbindungsstellen und resultierende Fragmentgrößen

Zunächst wurden loxP-tragende Plasmide mit der Cre-Rekombinase inkubiert. Nach Entfernung des Enzyms Cre wurde die in Wasser aufgenommene DNA als Template für die PCR mit den oben genannten Primern eingesetzt.



Nach Inkubation der Cre-Rekombinase mit dem Plasmid pUbi.2lox.pat konnte nach PCR neben einem 1 kbp langen Produkt ein etwa 200 bp langes Fragment amplifiziert werden (Abb. 11 I; Spur 1). Letzteres entspricht der erwarteten Fragmentgröße nach Exzision des von loxP-Sequenzen umgebenden *pat*-Gens. Aus der PCR mit nicht-rekombinierter Plasmid-DNA des Vektors pUbi.2lox.pat resultiert eine Bande mit einer Größe von 1 kbp (Abb. 11 I; Spur 3).

Um *site*-spezifische Integration nachzuweisen, wurde die Rekombinase mit einem promotorlosen *gus*-Konstrukt mit einer loxP-Sequenz (*plox.gus*) und dem Plasmid pUbi.lox.nos inkubiert. Nach einem *nested*-PCR-Ansatz konnte neben einem 500 bp langen Produkt, das dem Amplifikat aus dem nicht-rekombinierten Plasmid pUbi.lox.nos entspricht, ein 2,4 kbp langes Fragment amplifiziert werden (Abb. 11 I; Spur 2). Der Längenunterschied zwischen rekombinierter und nicht-rekombinierter DNA entspricht der Länge der *gus*-Kodierregion. Die Größe des PCR-Produktes aus dem Plasmid pUbi.gus (Abb. 11 I; Spur 6) beträgt ebenfalls etwa 2,4 kbp. Dieses Plasmid besteht, wie auch die loxP-tragenden

Plasmide, aus dem pUC19-Rückgrat, dem Ubiquitin1-Promotor, dem *gus*-Gen und dem nos-Terminator; die Rekombinationsstellen fehlen diesem Vektor.

Die circa 1,6 kbp Bande wurde möglicherweise während des *nested*-PCR-Ansatzes unspezifisch amplifiziert. Wurde das promotorlose *gus*-Konstrukt als Template für die PCR eingesetzt, konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden, da nur ein Primer im Plasmid bindet (Abb. 11 I; Spur 5).

### 3 Transiente Expressionsanalysen im monokotylen Weizen

Um die Funktionalität der beiden Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT *in vivo* zu überprüfen, wurde ein transientes Expressionssystem etabliert.

Diesem *in vivo*-Test liegt folgende Idee zu Grunde. Die Rekombinationsereignisse werden durch die Rekombinase katalysiert, die durch das entsprechende Plasmid exprimiert werden kann. Rekombination zwischen der auf dem Ubiquitin1-Promotor folgenden Erkennungssequenz auf einem Plasmid und der Erkennungssequenz, an die sich eine promotorlose *gus*-Sequenz anschließt, auf einem weiteren Plasmid führt zur Integration des *gus*-Gens stromabwärts des Ubiquitin1-Promotors und damit zu einem exprimierbaren *gus*-Gen (siehe Abb. 10 B). Die Aktivität des Genprodukts, der  $\beta$ -Glukuronidase, ist durch eine histochemische Färbung zum Nachweis der  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität visualisierbar.

Scutella von unreifen Weizenembryonen wurden biolistisch mit allen Komponenten der Rekombinationssysteme transformiert: Mit Erkennungssequenzen-enthaltenen Konstrukten und den korrespondierenden Rekombinasegen-tragenden Plasmiden. Nach 3 Tagen wurde ein histochemischer GUS-Test durchgeführt und die Anzahl der Signale bestimmt.

#### 3.1 *In vivo*-Rekombination mit dem Cre/loxP-System

Um Rekombinase-vermittelte Integration nachweisen zu können, wurden Weizenembryonen mit den Konstrukten pUbi.lox.nos, plox.*gus* und pUbi::*cre* transformiert. Damit standen die Bestandteile des Rekombinationssystems Cre/loxP zur Verfügung.

Insgesamt wurden 298 Embryonen in 10 unabhängigen Experimenten biolistisch transformiert. Die Embryonen zeigten in 6 Einzelversuchen durchschnittlich 11,9 GUS-Signale pro Embryo (Tab. 1). Da die Anzahl der Signale auch in der Positivkontrolle (mit pUbi.*gus* transformierte Embryonen) stark schwankte, wurde die Signalzahl auf den Embryonen in jedem unabhängigen Experiment auf die Signalzahl der jeweiligen

Positivkontrolle bezogen. Es ergab sich ein prozentualer Anteil von 17,15 % im Vergleich zur Positivkontrolle, in der das *gus*-Gen konstitutiv exprimiert wurde.

**Tab. 1:** Auswertung der transienten Expressionstests mit loxP-enthaltenen Plasmiden in Weizenembryonen.

Plasmide	Embryonen / Anzahl der Beschüsse	GUS-Signale insgesamt	Signal / Embryo	% Anteil der GUS-Signale an Positivkontrolle
A C D	50 / 2	619	12,38	33,70
+	25 / 1	1837	73,48	100,00
D	25 / 1	0	0	0
A C D	60 / 2	122	2,03	9,31
A C D	60 / 2	86	1,43	6,56
+	25 / 1	546	21,84	100,00
D	25 / 1	0	0	0
A C D	34 / 1	1231	36,21	34,69
A C D	34 / 1	653	19,21	18,40
+	25 / 1	2609	104,36	100,00
D	20 / 1	0	0	0
A C D	60 / 2	6	0,10	0,23
+	45 / 1	1951	43,36	100,00
D	29 / 1	0	0	0
B C D	60 / 2	122	2,03	4,69
B C D	50 / 2	21	0,42	2,71
+	25 / 1	387	15,48	100,00
D	60 / 2	1	0,02	0,13
B C D	30 / 1	26	0,87	7,20
B C D	30 / 1	8	0,27	2,21
+	26 / 1	313	12,04	100,00
D	25 / 1	0	0	0
B C D	50 / 2	81	1,63	2,22
+	25 / 1	1837	73,48	100,00
D	30 / 1	3	0,10	0,14

A pUbi.lox.nos  
 B pUbi.2lox.pat  
 C pUbi::cre  
 D plo<sub>x</sub>.gus  
 + pUbi.gus (Positivkontrolle)

Ein weiterer Versuchsansatz sollte sowohl Exzision als auch Integration aufzeigen. Dazu wurde statt des Konstruktes pUbi.lox.nos mit nur einer loxP-Erkennungssequenz, ein Plasmid mit zwei loxP-Sequenzen verwendet, welche das *pat*-Gen flankieren. Des weiteren wurden die Plasmide plo<sub>x</sub>.gus und pUbi::cre co-transformiert. Die kinetisch bevorzugte Exzisionsreaktion, katalysiert durch die Cre-Rekombinase, sollte zur Eliminierung des *pat*-Gens führen, das daraufhin mit einer loxP-site zirkulär vorliegt. An der verbleibenden Ubi.lox-

Sequenz kann es daraufhin zur Rückreaktion kommen, das heißt zur Re-Integration des *pat*-Gens, oder aber zur Integration des promotorlosen *gus*-Gens (*plox.gus*), das wie das zirkuläre *pat*-Gen ebenfalls eine einzelne loxP-Sequenz enthält.

Insgesamt wurden 220 Embryonen in 8 Beschüssen mit den genannten Konstrukten transformiert (Tab. 1). Nach histochemischer GUS-Färbung konnten durchschnittlich 1,04 Signale pro beschossenen Embryo gezählt werden. In 5 unabhängigen Versuchen ergab sich ein prozentualer Anteil von 3,81 % im Vergleich zur Positivkontrolle.

Alle mit *pUbi.gus* als Positivkontrolle transformierten Embryonen zeigten eine  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität. Um zu überprüfen, wie oft eine zufällige Integration von loxP-Transgenen ohne die Anwesenheit der Rekombinase erfolgt, wurden Weizenembryonen als Negativkontrolle mit einer promotorlosen loxP-*gus*-Sequenz transformiert. Diese Negativkontrollen zeigten eine sehr geringe  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität. Lediglich in 2 von 7 Experimenten wurde eine Signalanzahl von 0,02 bzw. 0,10 pro Embryo gezählt (Tab. 1). Diese kann aus zufälligen Integrationen des promotorlosen *gus*-Gens in die Nähe eines Weizen-spezifischen Promotors resultieren.



**Abb. 12:** Histochemische Färbung zum Nachweis der  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität in transient transformierten Weizenembryonen.

- 1 *pUbi.lox.nos* + *plox.gus* + *pUbi::cre* (B C D)
- 2 *pUbi.2lox.pat* + *plox.gus* + *pUbi::cre* (A C D)
- 3 *pUbi.gus* (Positivkontrolle)
- 4 *plox.gus* (Negativkontrolle)

In transient mit den Komponenten des Rekombinationssystems *Cre/loxP* transformierten Weizenscutella wurden Rekombinationsereignisse durch Integration eines promotorlosen lox-*gus*-Konstruktes stromabwärts des *Ubi1*-Promotors nachgewiesen (1). Gleichzeitige Exzision und Integration konnten durch Verwendung eines Konstruktes aufgezeigt werden, in dem zwei loxP-Sequenzen das *pat*-Gen flankieren. Nach Exzision des *pat*-Gens kann die lox-*gus*-Sequenz an der verbleibenden Erkennungs-*site* integrieren und zu einem exprimierbaren *gus*-Gen führen (2).

### 3.2 *In vivo*-Rekombination mit dem Flp/FRT-System

Die Fähigkeit des Flp/FRT-Systems zur Rekombination in transient transformierten Weizenscutella wurde methodisch, wie im vorangegangenen Kapitel 3.1 für das *Cre/loxP*-System beschrieben, untersucht.

Zum Nachweis der sequenz-spezifischen Integration wurden Embryonen mit den Plasmiden *pUbi.FRT.nos*, *pFRT.gus* und *pAct1::flp* transformiert.

Verglichen mit Embryonen, die in dem Testsystem mit allen zur sequenz-spezifischen Rekombination nötigen Konstrukten transformiert wurden, ist diese Signalzahl vernachlässigbar.

In Abb. 12 sind beispielhaft transient transformierte Weizenscutella nach der histochemischen Färbung dargestellt. Blaue Signale zeigen  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität an.

In sieben unabhängigen Versuchen wurden insgesamt 276 Embryonen in 11 Beschüssen transformiert und nach histochemischer GUS-Färbung durchschnittlich 4,6 Signale pro beschossenem Embryo gezählt. Verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle betrug der prozentuale Anteil damit 11,28 % (Tab. 2).

**Tab. 2:** Auswertung der transienten Expressionstests mit FRT-enthaltenen Plasmiden in Weizenembryonen.

Plasmide	Embryonen / Anzahl der Beschüsse	GUS-Signale insgesamt	Signal / Embryo	% Anteil der GUS-Signale an Positivkontrolle
A C D	39 / 2	467	11,97	31,16
A C D	40 / 2	620	15,50	40,33
+	30 / 1	1153	38,43	100,00
D	20 / 1	0	0	0
A C D	35 / 1	6	0,17	0,58
A C D	35 / 1	5	0,14	0,49
+	20 / 1	587	29,35	100,00
D	14 / 1	0	0	0
A C D	26 / 1	15	0,58	1,53
A C D	20 / 1	1	0,05	0,13
B C D	30 / 1	68	2,27	6,02
+	20 / 1	753	37,65	100,00
D	20 / 1	0	0	0
A C D	81 / 3	328	4,05	4,75
B C D	82 / 3	145	1,77	2,07
+	31 / 1	2645	85,32	100,00
D	20 / 1	0	0	0
B C D	66 / 2	63	0,95	1,83
+	23 / 1	1200	52,17	100,00
D	35 / 1	0	0	0
B C D	45 / 2	10	0,22	4,68
B C D	44 / 2	2	0,05	0,96
B C D	43 / 2	24	0,56	11,75
+	16 / 1	76	4,75	100,00
D	25 / 1	0	0	0

A pUbi.FRT.nos  
 B pUbi.2FRT.pat  
 C pAct1::flp  
 D pFRT.gus  
 + pUbi.gus (Positivkontrolle)

Um sowohl Exzision als auch Integration nachzuweisen, wurden Weizenscutella mit den Konstrukten pUbi.2FRT.pat, pFRT.gus und pAct1::flp transformiert. In sechs unabhängigen Experimenten wurden 310 Embryonen in 12 Beschüssen transformiert. Es konnten im Durchschnitt 0,97 Signale pro Embryo beobachtet werden (Tab. 2). Der prozentuale Anteil betrug, bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle, 4,55 %.

Während in allen mit pUbi.gus als Positivkontrolle transformierten Embryonen  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigten Embryonen, die transient mit dem promotorlosen gus-Gen (pFRT.gus) transformiert wurden, in allen Kontrollversuchen keine Signale.

Tabelle 3 stellt die Ergebnisse der transienten Transformationsexperimente beider Rekombinationssysteme gegenüber. Alle verwendeten Konstrukte, sowohl Rekombinasegene- als auch die dazugehörigen Erkennungssequenzen-tragende, sind funktionell. In transient transformierten Weizenscutella konnten Rekombinationsereignisse beider Systeme *in vivo* nachgewiesen werden. Damit wurde die Voraussetzung für die stabile Integration der Rekombinationssysteme in *Zea mays* L. gegeben.

**Tab. 3:** Gegenüberstellung der prozentualen Anteile an Rekombinationsereignissen der beiden verwendeten Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT im Vergleich zur Positivkontrolle (mit pUbi.gus transformierte Wildtyp-Embryonen).

Nachgewiesene Rekombinationsereignisse	Prozentualer Anteil im Vergleich zur Positivkontrolle (100%)	
	Cre/loxP	Flp/FRT
Integration	17,15 %	11,28 %
Exzision und Integration	3,81 %	4,55 %

#### 4 Stabile Transformation von Mais

Um die Funktionalität der Rekombinationssysteme in monokotylen Pflanzen zu untersuchen, sollten Maispflanzen stabil transformiert werden.

Der Transfer der Transgene in Mais erfolgte nach der von Brettschneider *et al.* (1997) etablierten Methode zur biolistischen Transformation von unreifen Maisembryonen.

Zunächst wurden in Co-Transformationsexperimenten Einzeltransformanden erzeugt, die eines der beiden Rekombinasegene *cre* oder *flp* und das Selektionsmarkergen *pat* aus dem Plasmid p35SAcS enthalten. Insgesamt wurden in 11 unabhängigen Transformationsexperimenten 1049 unreife Maisembryonen mit pUbi::*cre* und in 10 unabhängigen Experimenten 675 Embryonen mit pAct1::*flp* beschossen. Weitere Einzeltransformanden sollten das von den Erkennungssequenzen loxP bzw. FRT flankierte Selektionsgen *pat* tragen. In 8 unabhängigen Experimenten wurden 979 unreife Maisembryonen mit dem Konstrukt pUbi.2lox.pat transformiert; 198 Embryonen wurden in einem Versuch zur Transformation mit pUbi.2FRT.pat eingesetzt.

Nach einer etwa 10-wöchigen *in vitro*-Kulturphase, die eine erste Selektion mit dem Phosphinothricin-haltigen Herbizid Basta® umfasste, wurden die Regenerate in Erde gepflanzt und im Gewächshaus kultiviert. Die Pflanzen wurden erneut durch Besprühen mit einer wässrigen Basta®-Lösung (250 mg/l) selektiert und resistente Pflanzen molekular analysiert. Die Transformationsrate lag zwischen 2,2 und 3,2 %.

Die Tabelle 4 fasst die Transformationsexperimente für die einzelnen Konstrukte zusammen. Die durchschnittliche Transformationsrate von 2,7 % liegt im Bereich der von Brettschneider *et al.* (1997) veröffentlichten Effizienz von 2 bis 4 %.

**Tab. 4:** Zusammenfassung der Transformationsexperimente für die verwendeten Transformationsvektoren.

Konstrukt	Anzahl beschossener Embryonen	Anzahl Basta®-resistenter Regenerate	Transformations-effizienz in %	Vollständige Integration des Transgens
pUbi::cre	1049	34	3,2	19
pAct1::flp	675	19	2,8	10
pUbi.2lox.pat	979	22	2,2	12
pUbi.2FRT.pat	198	5	2,5	5

#### 4.1 Transgennachweis

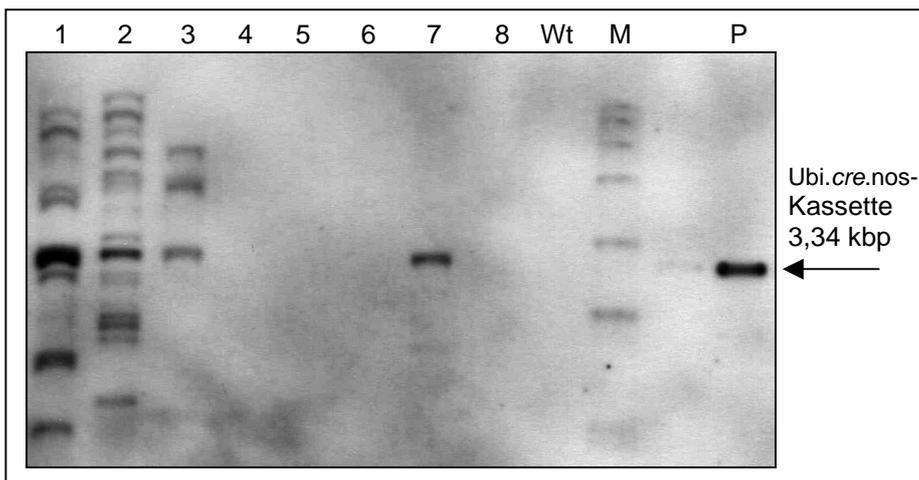
Für die Expression der Transgene muss die Integration der vollständigen Transgenkassette in das Pflanzengenom sichergestellt sein.

Um die vollständige Integration des Transgens nachzuweisen und die Anzahl der integrierten Genkopien zu bestimmen, wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt.

Die Anzahl der hybridisierenden Fragmente nach Restriktion der genomischen DNA mit einem den Transformationsvektor linearisierenden Enzym entspricht der Anzahl der Transgenkopien im Genom. Die Vollständigkeit der integrierten Promotor-Gen-Terminator-Kassette wurde durch Ausschneiden der kompletten Kassette mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft.

##### 4.1.1 Nachweis der Integration des cre-Rekombinasegens

Die Integration der vollständigen Transgenkassette, bestehend aus dem Ubiquitin1-Promotor, dem cre-Rekombinasegen und dem nos-Terminator erfolgte durch Restriktion mit *HindIII/EcoRI*. Elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet, konnte das Transgen mithilfe einer DIG-markierten DNA-Sonde (281 bp lange cre-Sequenz) detektiert werden.



**Abb. 13:** Nachweis des *cre*-Gens in  $T_0$ -Pflanzen.

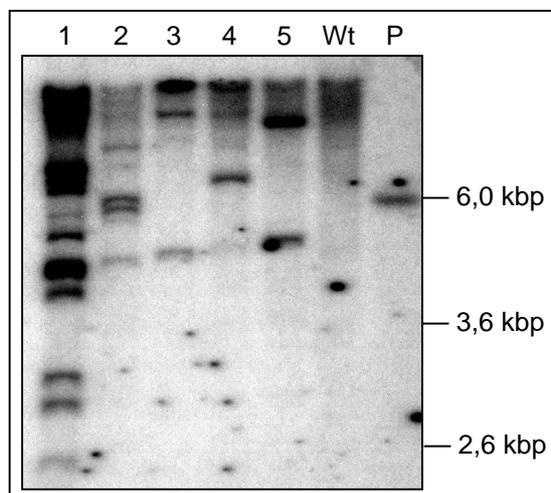
20  $\mu$ g genomische DNA der  $T_0$ -Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der Transgenkassette (3,34 kbp) mit *HindIII/EcoRI* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 281 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus pUbi::*cre* amplifiziert wurde, gegen die *cre*-Sequenz.

1	C 1-1	7	C 8-2
2	C 2-1	8	C 8-3A
3	C 5-2	Wt	Wildtyp
4	C 6-2A	M	DIG-Marker VII
5	C 6-2B	P	Positivkontrolle
6	C 8-1A		(100 pg pUbi:: <i>cre</i> , <i>HindIII/EcoRI</i> -verdaut)

Die Southern Blot-Analyse zeigte, dass 19 unabhängigen Linien (bezeichnet mit „C“) mindestens ein intaktes *cre*-Transgen im Genom enthalten. Beispielfhaft zeigt Abbildung 13 vier Linien, C 1-1, C 2-1, C 5-2 und C 8-2 (Abb. 13; Spuren 1, 2, 3 und 7), die die vollständige *cre*-Kassette mit einer Länge

von 3,34 kbp beinhalten, aber auch Regenerate, die wie der Wildtyp kein *cre*-Transgen tragen, wie die Linien C 6-2 A,B; C 8-1A und C 8-3A (Abb. 13; Spuren 4, 5, 6 und 8). Die Anzahl der hybridisierenden Fragmente ist in zwei gezeigten Linien C 1-1 und C 2-1 (Abb. 13; Spuren 1 und 2) sehr hoch, was vermutlich auf die Integration von vielen nicht-intakten Transgenen während der biolistischen Transformation zurückzuführen ist.

Zur Bestimmung der Anzahl der integrierten Genkopien wurde die genomische DNA mit *Acc65I* restringiert, ein Enzym, das nur einmal im Vektor pUbi::*cre* schneidet. In Southern Blot-Analysen wurde der gesamte 1,5 kbp lange Ubi1-Promotor mit einer [ $^{32}$ P]-dCTP-markierten DNA-Sonde detektiert. Die Mindestanzahl der integrierten Kopien lag zwischen 1 und etwa 10, exemplarisch für 5 Linien gezeigt in Abbildung 14. So konnten beispielsweise in der Linie C 9-5A (Abb. 14; Spur 3) mindestens 3 Transgenkopien



**Abb. 14:** Nachweis des *cre*-Transgens in  $T_0$ -Pflanzen.

25  $\mu$ g genomische DNA der  $T_0$ -Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens mit *Acc65I* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einer 1,5 kbp [ $^{32}$ P]-dCTP-markierten Ubi1-Promotor-Sonde.

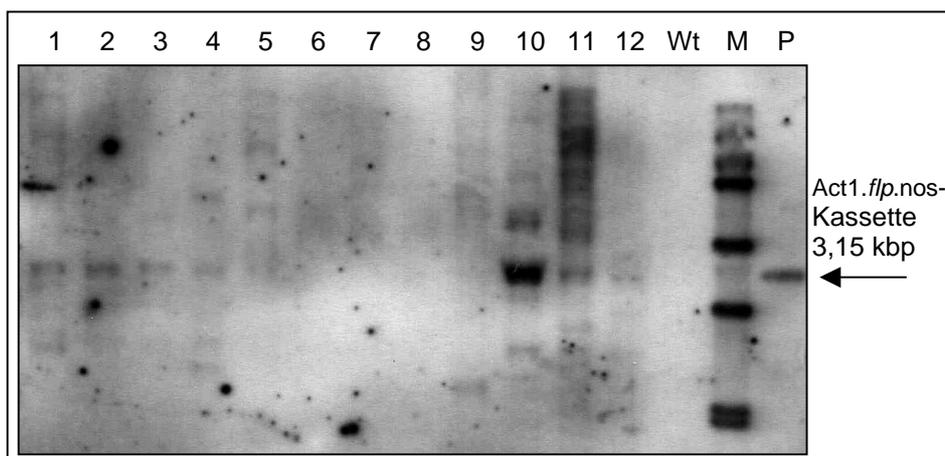
1	C 1-1	Wt	Wildtyp
2	C 8-2	P	Positivkontrolle
3	C 9-5A		(30 pg pUbi:: <i>cre</i> , <i>EcoRI</i> -verdaut)
4	C 9-16		
5	C 9-17		

nachgewiesen werden; die Linie C 1-1 (Abb. 14; Spur 1) zeigte durch das Auftreten zahlreicher Banden eine mehrfache Transgenintegration, was auf die Konkatamerbildung bei der biologischen Transformation zurückzuführen ist.

Da das maisinterne Ubiquitin ebenfalls mit der Sonde hybridisiert, war auch eine hochmolekulare Bande im nicht-transgenen Wildtyp zu detektieren.

#### 4.1.2 Nachweis der Integration des *flp*-Rekombinasegens

Der Nachweis des vollständigen *flp*-Transgens erfolgte durch Restriktion der genomischen DNA mit *Xho*I/*Ksp*AI. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten DNA-Sonde, die mit einem 218 bp langen Bereich des *flp*-Gens hybridisiert. Abbildung 15 zeigt beispielhaft eine



**Abb. 15:** Nachweis des *flp*-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

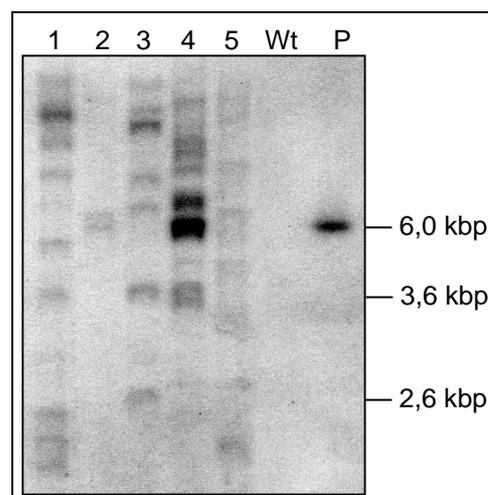
20 µg genomische DNA der T<sub>0</sub>-Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der Transgenkassette (3,15 kbp) mit *Xho*I/*Ksp*AI restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 218 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus pAct1::*flp* amplifiziert wurde, gegen die *flp*-Sequenz.

1	F 1-3	9	F 5-1
2	F 1-5A	10	F 6-3
3	F 1-5B	11	F 6-4
4	F 2-2	12	F 6-6
5	F 4-1	Wt	Wildtyp
6	F 4-2A	M	DIG-Marker VII
7	F 4-2B	P	Positivkontrolle
8	F 4-2D		(10 pg pAct1:: <i>flp</i> , <i>Xho</i> I/ <i>Ksp</i> AI-verdaut)

Southern Blot-Analyse von T<sub>0</sub>-Pflanzen, die mit dem *flp*-Gen transformiert wurden (bezeichnet mit „F“). Banden mit einer der Transgenkassette entsprechenden Größe von 3,15 kbp konnten in sieben gezeigten Linien, F 1-3, F 1-5A, B, F 2-2, F 6-3, F 6-4 und F 6-6 (Abb. 15; Spuren 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12) detektiert werden. Insgesamt konnten 10 unabhängige Linien mit der vollständigen *flp*-Transgenkassette nachgewiesen werden.

Die Kopienzahl konnte durch Restriktion der genomischen DNA mit dem den Transformationsvektor pAct1::*flp* linearisierenden Enzym *Acc65I* und einer radioaktiven UbiP-Sonde ermittelt werden.

Das Transgen integrierte mindestens mit einer Kopienzahl zwischen 1 und 11, exemplarisch gezeigt für 6 *flp*-Linien in Abbildung 16. Dabei zeigte die Linie F 1-5A mindestens zwei integrierte Kopien des *flp*-Transgens (Abb. 16; Spur 2), während die Linien F 1-5A und F 6-3 sehr komplexe Integrationsmuster aufwiesen (Abb. 16; Spuren 1 und 4).



**Abb. 16:** Nachweis des *flp*-Transgens in  $T_0$ -Pflanzen.

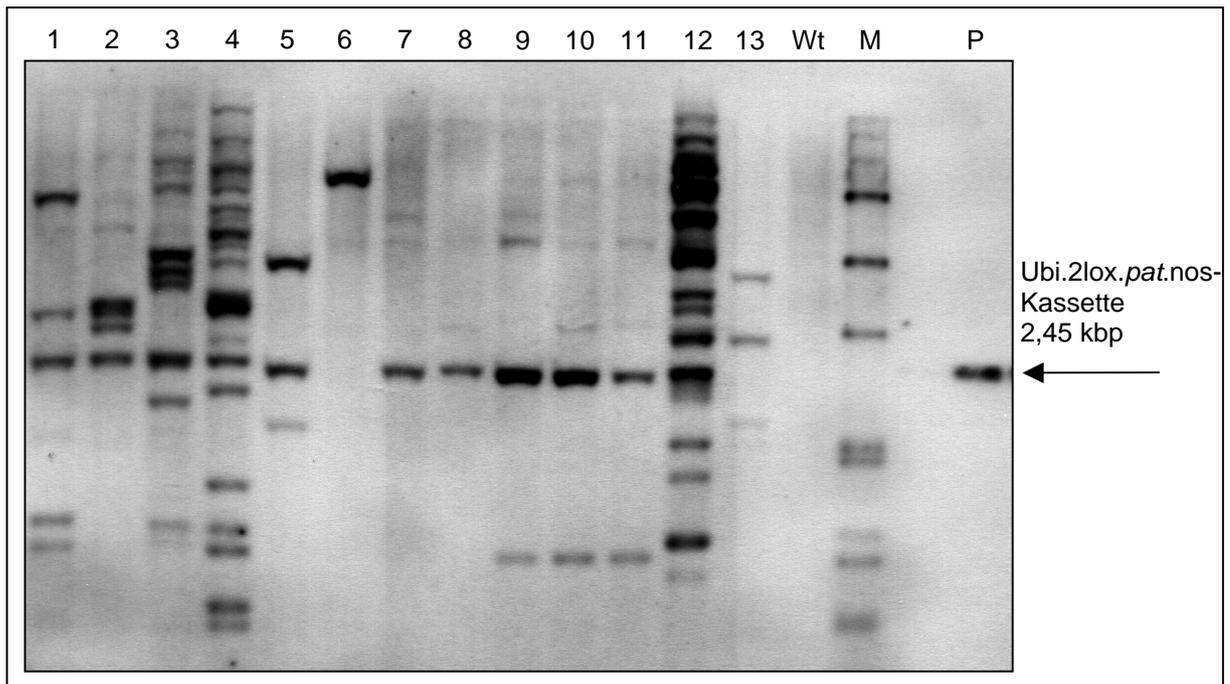
25 µg genomische DNA der  $T_0$ -Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens mit *Acc65I* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einer 1,5 kbp [ $^{32}$ P]-dCTP-markierten Ubi-Promotor-Sonde.

1	F 1-3	Wt	Wildtyp
2	F 1-5A	P	Positivkontrolle
3	F 4-1		(30 pg pAct1:: <i>flp</i> ,
4	F 6-3		<i>Acc65I</i> -verdaut)
5	F 6-9		

#### 4.1.3 Nachweis des loxP-flankierten Selektionsmarkers

Um die Vollständigkeit der Transgenkassetten, in denen jeweils zwei Erkennungssequenzen loxP bzw. FRT den Selektionsmarker *pat* umgaben, zu überprüfen, wurde *HindIII/EcoRI* verdaute, genomische DNA Southern Blot-Analysen unterzogen. Die Detektion des *pat*-Transgens erfolgte mithilfe einer DIG-markierten Sonde, die Homologie zu einem 485 bp langen Bereich des *pat*-Gens zeigte.

Es konnte in 12 Linien ein vollständiges Transgen mit loxP-Sequenzen nachgewiesen werden (bezeichnet mit „lox“). Exemplarisch zeigt Abbildung 17 die Southern Blot-Analyse von 11 unabhängigen Linien. Mit Ausnahme von zweien (Abb. 17; Spuren 6 und 13) zeigten alle getesteten Linien mindestens ein vollständig integriertes Transgen mit einer Länge von 2,45 kbp. Die komplexen Muster der Linien lassen sich durch die repetitive Anordnung von intakten und fragmentierten Transgenen erklären, die typisch für die biolistische Transformation sind.

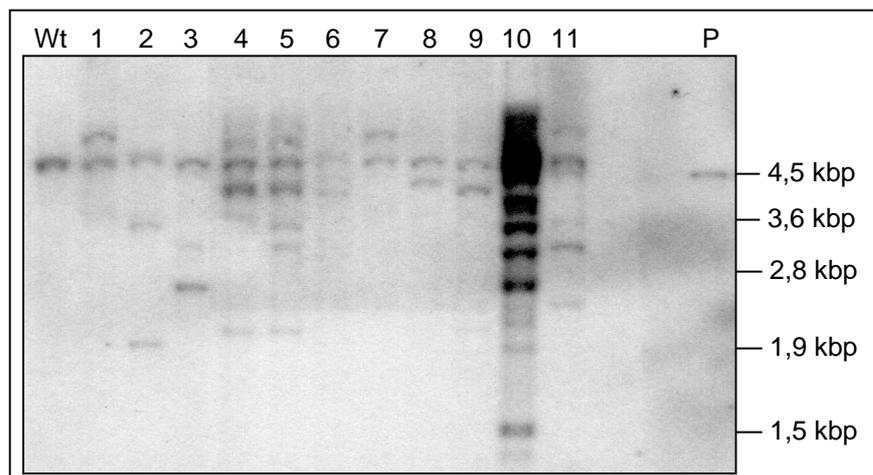


**Abb. 17:** Nachweis des von loxP-Sequenzen umgebenen *pat*-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

20 µg genomische DNA der T<sub>0</sub>-Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der Transgenkassette (2,45 kbp) mit *Hind*III/*Eco*RI restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 485 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus p35SACS amplifiziert wurde, gegen die *pat*-Sequenz.

1 lox 4-2	5 lox 9-3A	9 lox 25-1A	13 lox 21-1
2 lox 7-2	6 lox 9-4	10 lox 25-1B	Wt Wildtyp
3 lox 8-7	7 lox 9-10	11 lox 25-1C	M DIG-Marker VII
4 lox 8-10	8 lox 18-1	12 lox 19-2	P Positivkontrolle (50 pg pUbi.2lox.pat, <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI-verdaut)

Um die Anzahl der integrierten Kopien in Southern Blot-Analysen zu bestimmen, wurde genomische DNA mit der Endonuklease *Eco*RI restringiert, einem Enzym, das singularär im Transformationsvektor pUbi.2lox.pat schneidet. Mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Sonde konnte der 1,5 kbp große Ubiquitin1-Promotor detektiert werden. Die Mindest-



**Abb. 18:** Nachweis des Ubi.2lox.pat-Transgens in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

15 µg genomische DNA der T<sub>0</sub>-Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Kopienzahl des Transgens mit *Eco*RI restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einer 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi-Promotor-Sonde.

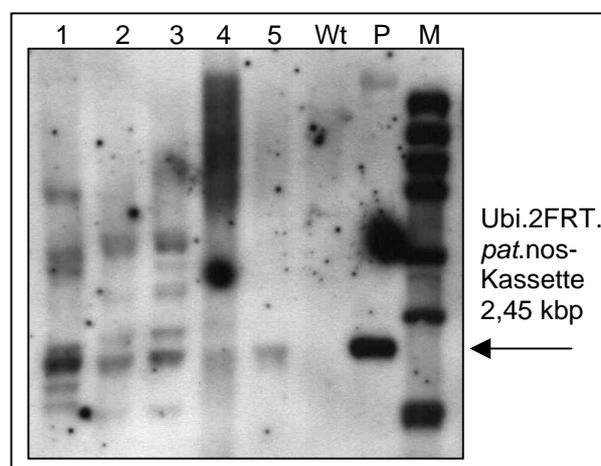
Wt Wildtyp		
1 lox 9-4	7 lox 9-10	
2 lox 9-5A	8 lox 14-1	
3 lox 9-5B	9 lox 10-2	
4 lox 9-6A	10 lox 19-2	
5 lox 9-6B	11 lox 9-1	
6 lox 9-8	P Positivkontrolle (10 pg pUbi.2lox.pat, <i>Eco</i> RI-verdaut)	

anzahl der integrierten Genkopien lag zwischen 1 und etwa 10; exemplarisch gezeigt in Abbildung 18. Während im nicht-transgenen Wildtyp nur eine Bande auftrat, die das maisinterne Ubiquitin repräsentiert, zeigen transgene Pflanzen mit dem Ubi.2lox.pat-Transgen weitere Banden. Klonale Linien, wie zum Beispiel lox 6-9A und lox 6-9B (Abb. 18; Spuren 4 und 5) wiesen das gleiche Bandenmuster auf.

#### 4.1.4 Nachweis des FRT-flankierten Selektionsmarkers

Die Analyse der 5 Maislinien mit dem von zwei FRT-Sequenzen umgebenen *pat*-Gen (bezeichnet mit „FRT“) ist in Abbildung 19 gezeigt. Mit *Hind*III/*Eco*RI-verdauter, genomischer DNA und einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Sonde konnte die Vollständigkeit der integrierten Transgenkassette (2,45 kbp) überprüft werden. Alle FRT-Linien 1 bis 5 (Abb. 19; Spuren 1 bis 5) besitzen mindestens eine intakte Integration.

Zur Ermittlung der Kopienzahl wurde die genomische DNA der FRT-Linien mit *Acc*65I restringiert. Diese Endonuklease schneidet nur einmal im Transformationsvektor pUbi.2FRT.*pat*. Nach Hybridisierung des Southern Blots mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Sonde konnte die Anzahl der Transgenkopien bestimmt werden. Das Transgen Ubi.2FRT.*pat* integrierte mit einer Anzahl von 1 bis 9 (exemplarisch gezeigt siehe Ergebnisse, Kapitel 5.2, Abbildung 26).



**Abb. 19:** Nachweis des von FRT-Sequenzen umgebenen *pat*-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

20 µg genomische DNA der T<sub>0</sub>-Pflanzen sowie des Wildtyps (A188) wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der Transgenkassette (2,45 kbp) mit *Hind*III/*Eco*RI restringiert. Die Hybridisierung der Southern Blots erfolgte mit einer 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi-Promotor-Sonde.

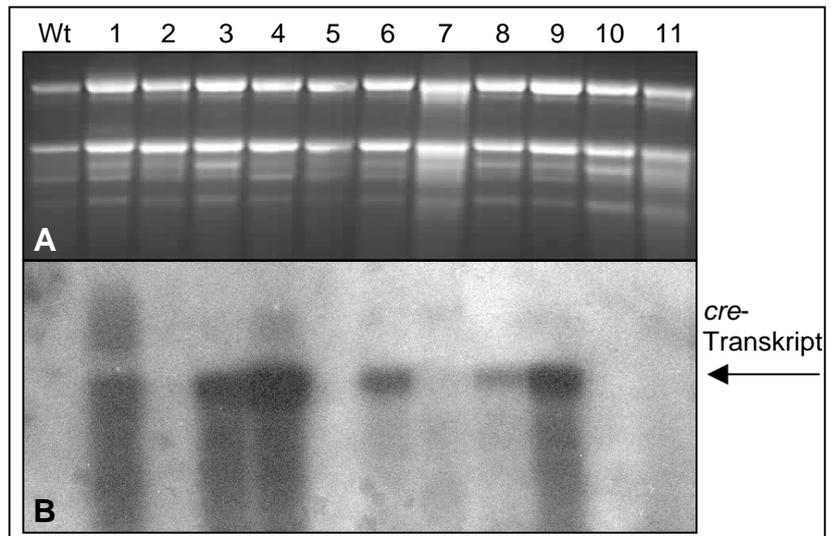
1	FRT 1	Wt	Wildtyp
2	FRT 2	P	Positivkontrolle
3	FRT 3		(20 µg pUbi.2FRT. <i>pat</i> ,
4	FRT 4		<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI-verdaut)
5	FRT 5	M	DIG-Marker VII

## 4.2 Transkription der Rekombinasegene in T<sub>0</sub>-Pflanzen

Der Nachweis der Transkription der Rekombinasegene *cre* und *flp* erfolgte durch Northern Blot-Analysen. Von positiv auf vollständig integrierte Transgenkopien getesteten Pflanzen wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial isoliert. Jeweils 15 µg RNA wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mithilfe von [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten *cre*- bzw. *flp*-markierten DNA-Sonden detektiert.

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis einer Northern Blot-Analyse zum Nachweis der *cre*-Expression von mit pUbi::*cre* transformierten T<sub>0</sub>-Pflanzen und einer nicht-transgenen Kontrolle (Wt). *cre*-Transkripte konnten in den Linien C 1-1, C 6-3, C 8-2, C 9-5A, C 9-16 und C 9-17 (Abb. 20 B; Spuren 1, 3, 4, 6, 8 und 9) nachgewiesen werden. Im nicht-transgenen Wildtyp konnte keine *cre*-RNA detektiert werden, ebenso in den *cre*-Linien C 5-2, C 9-2A, C 9-19 und C 12-1 (Abb. 20 B; Spuren 2, 5, 10 und 11), obwohl in diesen Linien die vollständige Transgenkassette nachgewiesen wurde.

Die Transkription von *flp*-Pflanzen konnte, wie in Abbildung 21 gezeigt, nachgewiesen werden. Die Linien F 1-3, F 1-5A, F 4-1 und F 6-9 (Abb. 21 B; Spuren 1, 2, 4, 5 und 6) zeigen im Gegensatz zu den Linien F 2-2 und F 7-3 (Abb. 21 B; Spuren 3 und 7) und dem Wildtyp ein deutliches Signal des *flp*-Transkripts und eignen sich daher für den Einsatz in späteren Kreuzungsversuchen. In den Linien F 6-6, F 7-3 und F 14-4 (Abb. 21 B; Spuren 5, 7 und 8) konnte kein distinktes Signal detektiert werden.



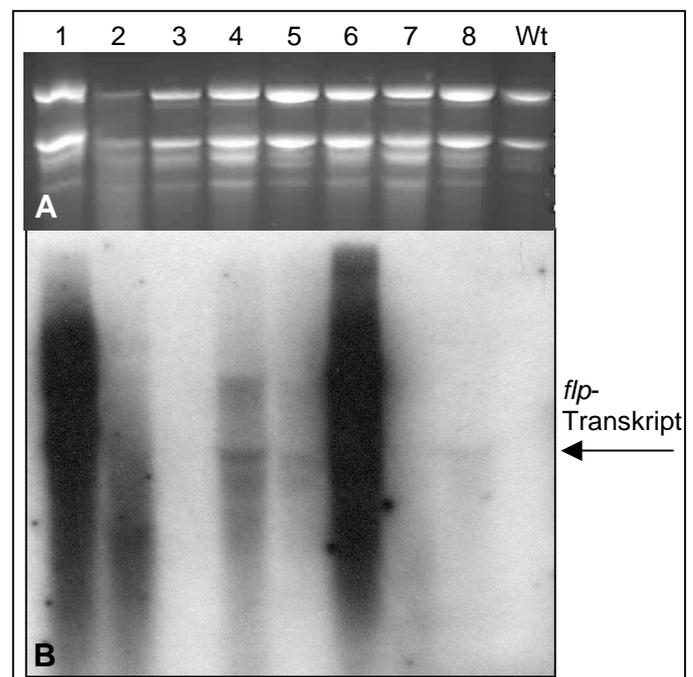
**Abb. 20:** Nachweis des *cre*-Transkripts durch Northern Blot-Analyse.

**A** Gelabbildung als Ladekontrolle.

**B** Northern Blot.

15 µg Gesamt-RNA aus Blättern von T<sub>0</sub>-Pflanzen und Wildtyp (A188) wurden aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten *cre*-DNA-Sonde.

Wt	Wildtyp	3	C 6-3	6	C 9-5A	9	C 9-17
1	C 1-1	4	C 8-2	7	C 9-8	10	C 9-19
2	C 5-2	5	C 9-2A	8	C 9-16	11	C 12-1



**Abb. 21:** Nachweis des *flp*-Transkripts durch Northern Blot-Analyse.

**A** Gelabbildung als Ladekontrolle.

**B** Northern Blot.

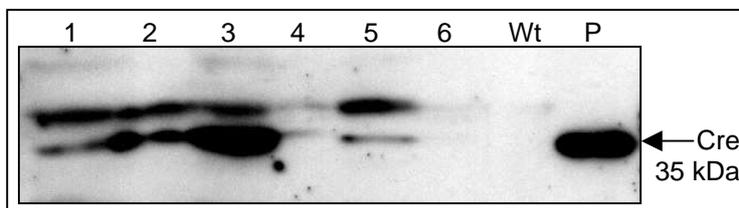
15 µg Gesamt-RNA aus Blättern von T<sub>0</sub>-Pflanzen und Wildtyp (A188) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten *flp*-DNA-Sonde.

1	F 1-3	4	F 4-1	7	F 7-3
2	F 1-5A	5	F 6-6	8	F 14-4
3	F 2-2	6	F 6-9	Wt	Wildtyp

### 4.3 Translation der Rekombinase in T<sub>0</sub>-Pflanzen

Die Translation des *cre*-Transkripts konnte durch Western Blot-Analysen nachgewiesen werden. Dazu wurde Gesamtprotein aus Blättern *cre*-transkribierender T<sub>0</sub>-Pflanzen isoliert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion des Cre-Proteins erfolgte mit einem Antikörper gegen die Cre-Rekombinase.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse von T<sub>0</sub>-Pflanzen, einer Positivkontrolle (Blattextrakt aus mit einem *cre*-expremierenden Virus infizierten Tabak;



**Abb. 22:** Nachweis des Cre-Proteins durch Western Blot-Analyse in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

Gesamt-Proteinextrakte aus Blättern von T<sub>0</sub>-Pflanzen und untransformierten Wildtyp (A188) wurden analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Cre-Antikörper.

1 C 1-1	3 C 8-2	5 C 9-16	Wt Wildtyp
2 C 6-3	4 C 9-5A	6 C 9-17	P Positivkontrolle

bereitgestellt von Dr. L. Kopertekh, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig) und einer nicht-transgenen Kontrolle (Wildtyp: A188). Mit Ausnahme der Linie C 9-17 (Abb. 22; Spur 6) sowie dem nicht-transgenen Wildtyp konnte in allen untersuchten Pflanzenlinien, C 1-1, C 6-3, C 8-2, C 9-5A und C 9-16 (Abb. 22; Spuren 1 bis 5) das Cre-Protein detektiert werden. Diese standen somit für Kreuzungsversuche zur Verfügung. In allen getesteten *cre*-Linien konnte zuvor die vollständige Integration und Transkription des Transgens nachgewiesen werden. Zusätzlich zur 35 kDa-Bande des Cre-Proteins, eindeutig identifizierbar durch den Vergleich mit der Positivkontrolle, traten vermutlich aufgrund von unspezifischen Hybridisierung des Antikörpers weitere Banden auf.

Das Fehlen einer Cre-Protein repräsentierenden Bande in der Linie C 9-17 (Abb. 22; Spur 6) könnte auf eine nicht ausreichende Sensitivität der Western Blot-Analyse zurückzuführen sein.

### 4.4 Nachweis der stabilen Vererbung der Transgene

Eine stabile Integration von Transgenen beinhaltet nicht nur die vollständige Integration und Expression der Transgene, sondern auch die zuverlässige Weitergabe an die nächsten Generationen nach den Mendelschen Gesetzen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen wurden mit dem Selektionsmarkergen *pat* transformiert und sind daher mit dem Herbizid Basta<sup>®</sup> selektierbar. Pflanzen mit loxP- oder FRT-*sites* tragen die *pat*-Sequenz, von zwei Erkennungssequenzen flankiert; Pflanzen, die die Rekombinasegene beinhalten, wurden mit dem *pat*-Gen co-transformiert. Da davon

auszugehen ist, dass während der biolistischen Transformation beide Gene am gleichen Locus integrieren, können Rekombinase- und Selektionsmarker gene auch zusammen vererbt werden, so dass eine Resistenz gegen das Herbizid Basta® auf die Integration der Rekombinase gene hinweist. Die Anzahl an Basta®-resistenten Nachkommen gibt Aufschluss über die Segregationsverhältnisse der Transgene.

Die Erzeugung von Nachkommen transgener Pflanzen erfolgte entweder durch Isolierung der Embryonen 3 bis 4 Wochen nach der Bestäubung und *in vitro*-Kultivierung auf MS-Medium oder durch Auskeimen von Saatgut auf Medium oder in Erde. Anschließend wurden die jungen Pflänzchen mit dem Herbizid Basta® selektiert.

Nach Selbstung der transgenen, heterozygoten T<sub>0</sub>-Pflanzen ist im monohybriden Erbgang ein Aufspaltungsverhältnis von 3:1 transgenen zu nicht-transgenen Pflanzen zu erwarten

**Tab. 5:** Vererbungsschema eines monohybriden Erbgangs eines dominanten Allels nach Selbstung von T<sub>0</sub>-Pflanzen.

Gameten	Transgen	Wildtyp
Transgen	<b>Transgen</b>	<b>Wildtyp</b>
Wildtyp	<b>Transgen</b>	Wt
	<b>Wildtyp</b>	Wt

(Tab. 5). Dies bedeutet, dass der Anteil an Basta®-resistenten Nachkommen theoretisch 75 % beträgt. Praktisch konnte gezeigt werden, dass sich beispielsweise von 20 T<sub>1</sub>-Nachkommen der flp-Linie F 6-6 zwölf als resistent gegenüber Basta® erwiesen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 60 %. Auch *pat*-Transgene der Linie lox 18-1 wurden mit dieser Häufigkeit vererbt.

Das Auskreuzen der Transgene mit Wildtyp-DNA erbringt einen theoretischen Anteil an Transgenen von 50 % in der T<sub>1</sub>-Nachkommenschaft (Tab. 6). Die tatsächlichen

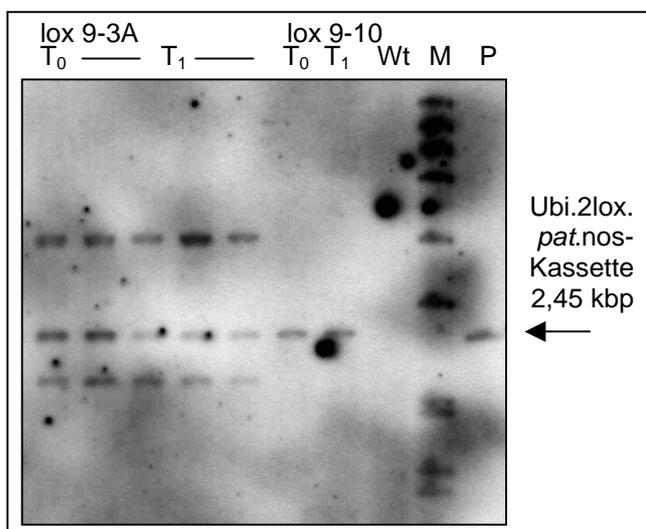
**Tab. 6:** Vererbungsschema eines monohybriden Erbgangs eines dominanten Allels nach Auskreuzung von T<sub>0</sub>-Pflanzen.

Gameten	Transgen	Wildtyp
Wildtyp	<b>Transgen</b>	Wildtyp
	<b>Wildtyp</b>	Wildtyp
Wildtyp	<b>Transgen</b>	Wildtyp
	<b>Wildtyp</b>	Wildtyp

Segregationshäufigkeiten der *pat*-Gene von Rekombinasegen- und Erkennungssequenz-tragenden Linien korrelieren mit der theoretischen Erwartung. So waren von 18 Nachkommen der Linien F 2-2 acht Basta®-resistent, also 44,4 %. Ähnlich wurde das *pat*-Transgen der Linie lox 9-10 vererbt; 7 von 15 T<sub>1</sub>-Nachfahren waren resistent gegen Basta®.

Die stabile Vererbung der Transgene sollte auch in Southern Blot-Analysen bestätigt werden. Der Nachweis der vollständigen Transgenkassette erfolgte durch Restriktion genomischer DNA mit *HindIII/EcoRI* und Hybridisierung des Southern Blots mit einer DIG-markierten *pat*-DNA-Sonde.

Exemplarisch zeigt Abbildung 23 eine Southern Blot-Analyse von T<sub>0</sub>- und T<sub>1</sub>-Pflanzen der Linien lox 9-3A und lox 9-10.



**Abb. 23:** Nachweis des von loxP-Sequenzen flankierten *pat*-Gens in T<sub>1</sub>-Pflanzen.

20 µg genomische DNA von T<sub>0</sub>-, T<sub>1</sub>- und untransformierten A188-Pflanzen wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der Transgenkassette (2,45 kbp) mit *Hind*III/*Eco*RI restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte gegen die *pat*-Sequenz mit einem 485 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus p35SACS amplifiziert wurde.

Es ist jeweils vergleichend das Bandenmuster des T<sub>0</sub>-Elters und deren T<sub>1</sub>-Nachfahren am Beispiel der Linien lox 9-3A und lox 9-10 dargestellt.

Wt untransformierter Wildtyp (A188)

M DIG-Marker VII

P Positivkontrolle

(20 µg pUbi.2lox.*pat*, *Hind*III/*Eco*RI -verdaut)

Alle Basta<sup>®</sup>-resistenten T<sub>1</sub>-Nachkommen des Ersttransformanden lox 9-3A zeigten dasselbe Bandenmuster wie die T<sub>0</sub>-Pflanze. Neben der vollständigen Genkopie wurden zwei weitere Banden detektiert. In beiden Generationen der Linie lox 9-10 trat nur die eine Bande, die die 2,45 kbp große, vollständige Genkassette Ubi.2lox.*pat.nos* repräsentiert, auf.

Sowohl die von loxP-sites flankierten *pat*-Transgene der Linie lox 9-3A als auch lox 9-10 konnten demnach erfolgreich an die F<sub>1</sub>-Generation weitergegeben werden.

## 5 Nachweis der Rekombination in der F<sub>1</sub>-Generation

### 5.1 Kreuzung von Rekombinase- mit Erkennungssequenzen-tragenden Linien

Durch Kreuzung von Maislinien wurden die beiden Komponenten der Rekombinationssysteme, die Rekombinase und die korrespondierenden Erkennungssequenzen, *in planta* zusammengeführt. Rekombination zwischen zwei gleichgerichteten Erkennungsstellen, die das Selektionsmarkergen *pat* flankieren, sollte zur Exzision des *pat*-Transgens führen.

Eine Voraussetzung für die Auswahl der Kreuzungspartner (*cre*- und *lox*-Linien, *flp*- und *FRT*-Linien) war die vollständige Integration der Transgene. Des weiteren erleichtert ein einfaches Integrationsmuster die Identifizierung der Transgene in den Nachfahren. Ein

weiteres Kriterium war die Expression der Transgene. *flp* und *cre* exprimierende Linien wurden durch Northern Blot- bzw. Western Blot-Analysen (nur Cre) identifiziert. Die dazugehörigen Erkennungssequenzen loxP bzw. FRT umgeben den Selektionsmarker *pat*, welcher eine Resistenz gegen das Herbizid Basta<sup>®</sup> vermittelt. Die Resistenz der Pflanzen gegen Basta<sup>®</sup> beweist daher die Expression der Transgene Ubi.2lox.*pat* bzw. Ubi.2FRT.*pat*. In Tabelle 7 sind alle Linien aufgeführt, die diese Voraussetzungen erfüllen.

**Tab. 7:** Übersicht über transgene Maislinien, die für Kreuzungsversuche verwendet werden konnten.

pUbi:: <i>cre</i>	pUbi.2lox. <i>pat</i>	pAct1:: <i>flp</i>	pUbi.2FRT. <i>pat</i>
C 1-1	lox 9-3A	F 1-3A	FRT 30-2
C 6-3	lox 9-10	F 1-5A	FRT 30-5
C 8-2	lox 18-1	F 4-1	
C 9-5A	lox 18-5	F 6-9	
C 9-16	lox 21-1		
C 9-17*	lox 25-1		

\* Protein unter der Nachweisgrenze, Transkription des Transgens aber nachgewiesen

Es wurden insgesamt 12 unabhängige Kreuzungen zwischen *cre*- und loxP-tragenden Linien durchgeführt, Nachkommen von 7 Kreuzungen wurden molekular näher untersucht. Pollendonoren waren sowohl *cre*- als auch loxP-tragende Linien.

*Flp* und FRT-tragende Linien wurden dreimal unabhängig gekreuzt und deren Nachkommen molekular analysiert.

## 5.2 Southern Blot-Analysen

In Southern Blot-Analysen wurde untersucht, ob die Integrationsmuster der Transgene in der F<sub>1</sub>-Generation denen der Parentallinien entsprechen und gegebenenfalls durch Rekombination verändert sind.

Dazu wurde DNA von Nachkommen aus Kreuzungen zwischen *cre*- und loxP-Linien in Southern Blot-Analysen mit einer radioaktiv markierten Ubi1-Promotor-DNA-Sonde hybridisiert. Da sowohl die *cre*-Rekombinase als auch das von loxP-Sequenzen flankierte *pat*-Transgen durch den Ubi1-Promotor kontrolliert werden, konnte die gleiche Sonde für die Detektion beider Transgene eingesetzt werden.

F<sub>1</sub>-Nachkommen von 5 unabhängigen Kreuzungen (K1, K6, K7, K29, K30) zeigten in Southern Blot-Analysen nur den paternalen Genotyp (Tab. 8). Dabei war es gleichgültig, ob *cre*- oder loxP-tragende Pflanzen als Pollendonoren fungiert haben.

Nur in 2 Kreuzungen konnten Pflanzen identifiziert werden, die sowohl maternale als auch paternale Transgene beinhalten (Tab. 8). Diese stammen aus Kreuzungen des gleichen loxP-tragenden Elters mit zwei unterschiedlichen cre-Rekombinase-Linien.

Da in Nachkommen der restlichen 5 Kreuzungen nur der paternale Genotyp vererbt wurde, scheinen die Transgene nicht nach den Gesetzen Mendels zu segregieren; eine gestörte Gametophytenentwicklung oder die geringe Stichprobenanzahl könnten ursächlich sein.

**Tab. 8:** Übersicht über Kreuzungen zwischen cre- und loxP-tragenden Maislinien und die daraus resultierenden F<sub>1</sub>-Nachkommen.

Kreuzung lfd. Nr	Maternaler Elter	X Paternaler Elter	Anzahl der F <sub>1</sub> - Nachkommen	Genotyp der transgenen F <sub>1</sub> -Nachkommen
K1	C 1-1	lox 21-1	20	paternal
K6	C 6-3	lox 9-10	20	paternal
K7	lox 9-10	C 6-3	25	paternal
K11	C 9-16	lox 9-3A	40	11 sowohl cre als auch loxP
K12	lox 9-3A	C 9-17	40	1 sowohl cre als auch loxP
K29	C 8-2	lox 18-1	20	paternal
K30	lox 18-1	C 8-2	32	paternal

Abbildung 24 zeigt beispielhaft die Analyse von 12 F<sub>1</sub>-Nachkommen der Kreuzung K11. Restriktion der Pflanzen-DNA mit *HindIII/EcoRI* führt zum Herausschneiden der vollständigen Ubi.2lox.pat-Kassette. Nach Hybridisierung mit der Ubi1-Sonde zeigte sich in der Elternlinie lox 9-3A (Abb. 24 B; Spur E2) neben der circa 5 kbp großen Bande, die auch in Wildtyp-DNA zu beobachten ist und das maisinterne Ubiquitin darstellt, und einer 3,6 kbp großen Bande eine 2,45 kbp große Bande, die der Länge der vollständigen Transgenkassette entspricht.

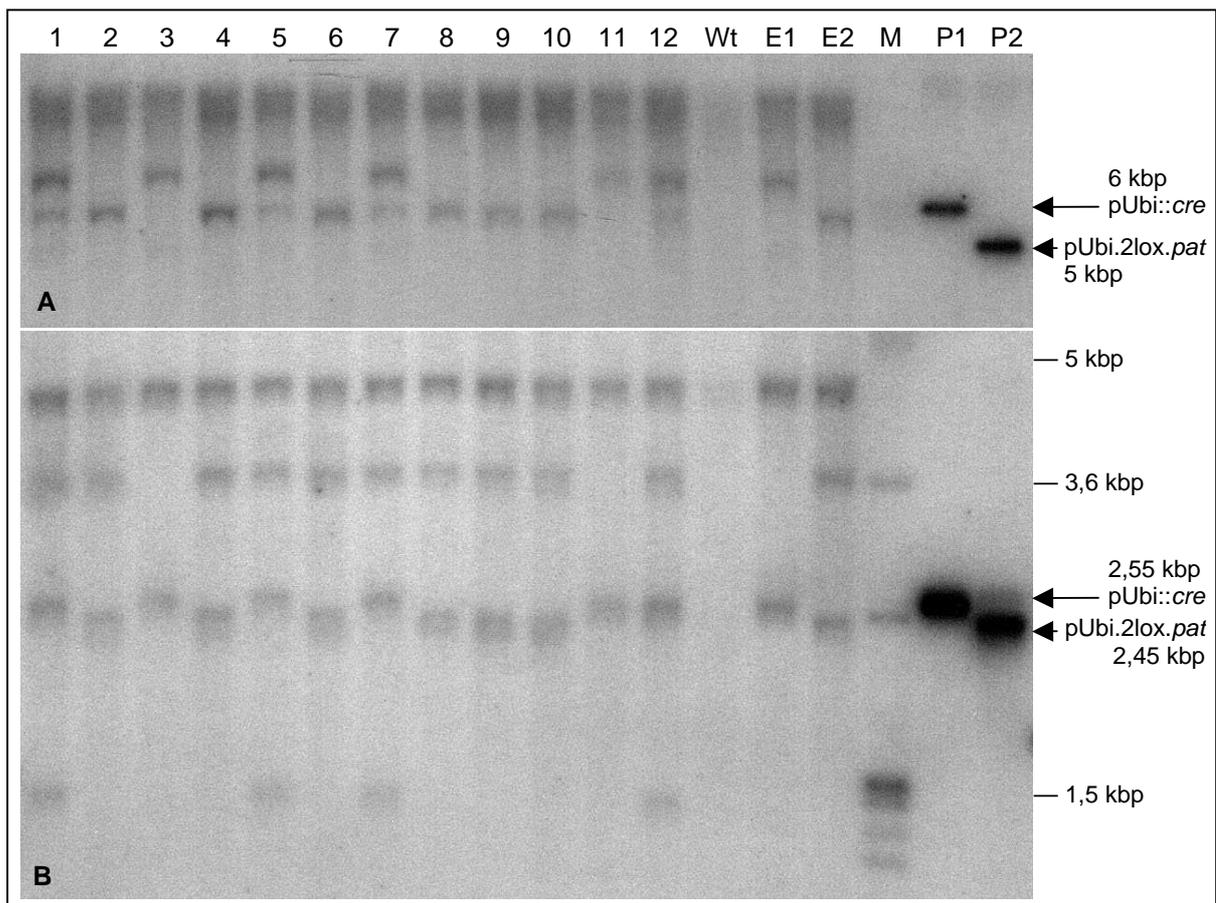
In vier gezeigten F<sub>1</sub>-Nachkommen #1, #5, #7 und #12 konnte die Bande der Größe 2,45 kbp nicht mehr detektiert werden, wohl aber ein 1,5 kbp großes Fragment (Abb. 24 B; Spuren 1, 5, 7 und 12). Diese Größe von 1,5 kbp entspricht der Transgenkassette ohne die DNA-Sequenzen zwischen den loxP-Erkennungsstellen.

In diesen vier Nachkommen sowie in 6 weiteren F<sub>1</sub>-Pflanzen wurde das 3,6 kbp große Fragment detektiert, welches auch im loxP-Elter nachzuweisen ist.

Die vollständige Transgenkassette der cre-Rekombinase konnte anhand einer 2,55 kbp langen Bande, die im cre-Elter C 9-16 (Abb. 24 B; Spur E1) auftrat, auch in den zwei Nachkommen #3 und #11 (Abb. 24 B; Spuren 3 und 11) nachgewiesen werden. Diese Pflanzen zeigten lediglich den Genotyp des maternalen cre-Elters.

Das *cre*-Transgen konnte aber auch in den Nachkommen detektiert werden, welche statt der vollständigen Ubi.2lox.pat-Kassette ein 1,5 kbp großes Fragment aufweisen. Nur diese 4 Nachkommen, #1, #5, #7 und #12, tragen also das maternale *cre*-Transgen und den paternalen Genotyp.

Die Anwesenheit der *cre*-Rekombinase und der Ubi.2lox.pat-Kassette in einer Pflanze führt demnach zum Verlust der Bande, die das vollständige Konstrukt repräsentiert.



**Abb. 24:** Southern Blot-Analyse von  $F_1$ -Pflanzen (Kreuzung K11).

25  $\mu$ g genomische DNA von  $F_1$ -Nachkommen aus Kreuzungen der Eltern C 9-16 und lox 9-3A wurden für die Bestimmung des Integrationsmusters **A** mit *Acc65I* und zum Herausschneiden der Transgenkassetten **B** mit *HindIII/EcoRI* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 1,5 kbp [ $^{32}$ P]-dCTP-markierten Ubi1-Fragment.

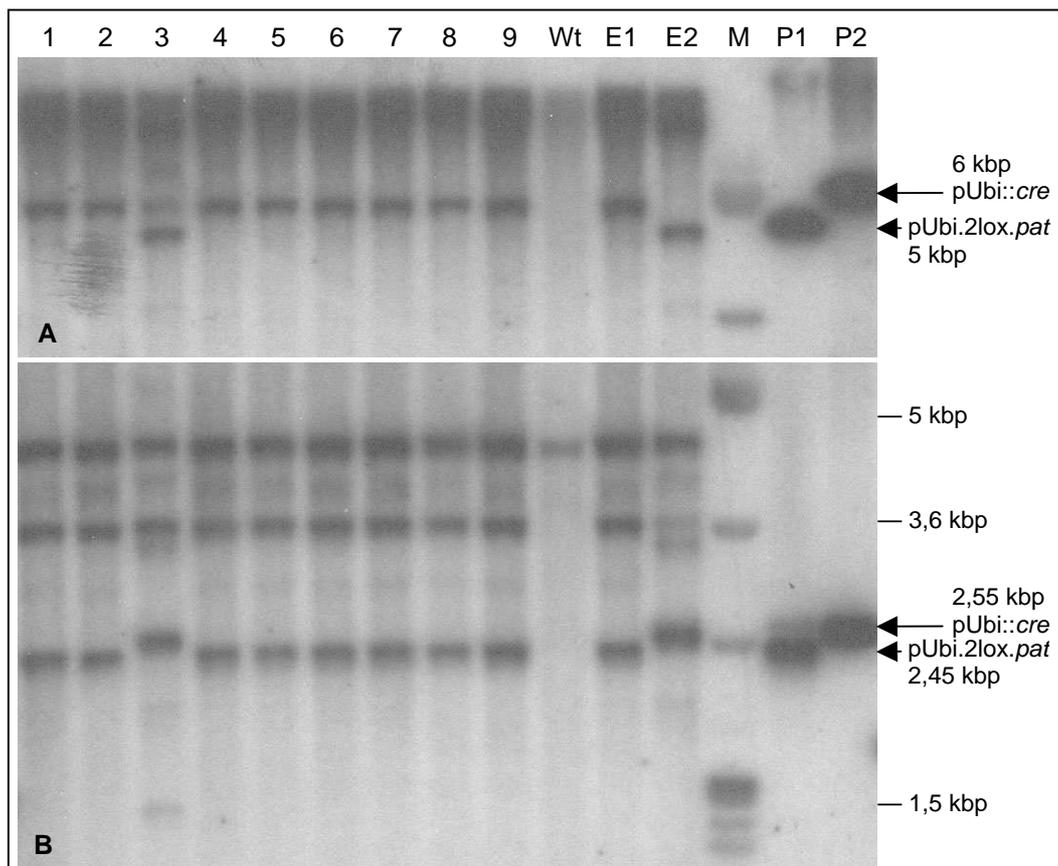
1 bis 12	K11#1 bis K11#12	P1	Positivkontrolle pUbi:: <i>cre</i> (30 pg)
Wt	Wildtyp A188	P2	Positivkontrolle pUbi.2lox.pat (30 pg)
E1	maternaler Elter C 9-16	M	Marker $\lambda$ /Avall
E2	paternaler Elter lox 9-3A		

Auch in der Southern Blot-Analysen mit *Acc65I*-verdauter Pflanzen-DNA (Abb. 24 A) konnten nur in diesen 4 Nachfahren (Abb. 24 A; Spuren 1, 5, 7 und 12) sowohl maternale als auch paternale Transgene nachgewiesen werden. In allen weiteren Nachkommen konnte entweder nur der maternale Genotyp nachgewiesen werden oder das paternale Muster.

Insgesamt wiesen 11 von 40 untersuchten  $F_1$ -Nachkommen der Kreuzung K11 neben einer 1,5 kbp langen Bande ein aus mütterlichen und väterlichen Transgenen bestehendes Muster

auf. Diese Pflanzen bildeten die Grundlage für weitere Experimente zur gerichteten Integration von loxP-Fragmenten.

In der Kreuzung K12, in der ebenfalls die Linie lox 9-3A Kreuzungspartner war, konnte in einem von 40 F<sub>1</sub>-Nachkommen eine 1,5 kbp lange Bande nachgewiesen werden, die dem um die loxP-flankierten Sequenzen verkürzten Transgen entspricht. Nur diese Pflanze zeigte sowohl maternale als auch paternale Transgene, während alle anderen Nachkommen nur dem Typus des loxP-Elters entsprachen (Abb. 25).



**Abb. 25:** Southern Blot-Analyse von F<sub>1</sub>-Pflanzen (Kreuzung K12).

25 µg genomische DNA von F<sub>1</sub>-Nachkommen aus Kreuzungen der Eltern lox 9-3A und C 9-17 wurden für die Bestimmung des Integrationsmusters **A** mit *Acc65I* und zum Herausschneiden der Transgenkassetten **B** mit *HindIII/EcoRI* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Fragment.

1 bis 9 K12#1 bis K12#9

Wt Wildtyp A188

E1 maternaler Elter lox 9-3A

E2 paternaler Elter C 9-17

P1 Positivkontrolle pUbi.2lox.pat (30 µg)

P2 Positivkontrolle pUbi::cre (30 µg)

M Marker λ/Avall

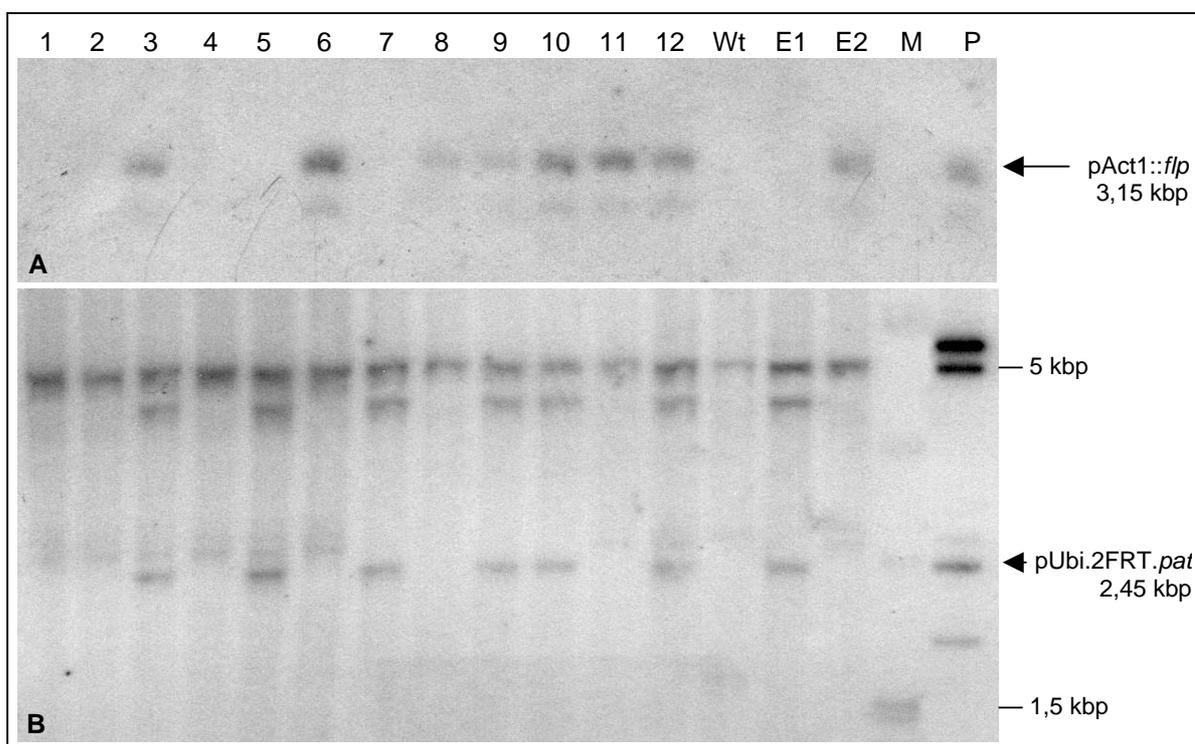
In jeder der drei unabhängigen Kreuzungen zwischen Pflanzen mit *flp*-Rekombinasegen und Pflanzen mit FRT-Erkennungssequenzen konnten Nachkommen identifiziert werden, die beide Transgene enthalten (Tab. 9).

Diese Kreuzungen unterschieden sich hinsichtlich des FRT-tragenden Elters nicht voneinander, hatten jedoch unterschiedliche *flp*-Rekombinase tragende Eltern.

**Tab. 9:** Übersicht über Kreuzungen zwischen *flp*- und FRT-tragenden Maislinien und die daraus resultierenden F<sub>1</sub>-Nachkommen.

Kreuzung lfd. Nr	Maternaler Elter	X Paternaler Elter	Anzahl der F <sub>1</sub> - Nachkommen	Genotyp der transgenen F <sub>1</sub> -Nachkommen
KA	F 6-9	FRT 30-5	20	1 sowohl <i>flp</i> als auch FRT
KF	F 1-5A	FRT 30-5	20	2 sowohl <i>flp</i> als auch FRT
KG	FRT 30-5	F 1-5A	40	4 sowohl <i>flp</i> als auch FRT

Abbildung 26 zeigt exemplarisch die Southern Blot-Analyse von F<sub>1</sub>-Nachkommen der Kreuzung KG. Zum einen wurde durch Restriktion mit den Enzymen *XhoI/KspAI* die vollständige Act1::*flp*-Kassette (Abb. 26 A), zum anderen mit *HindIII/EcoRI* die vollständige Ubi.2FRT.*pat*-Kassette (Abb. 26 B) herausgeschnitten. Zur Detektion wurden radioaktiv markierte Sonden, die mit der *flp*-Sequenz bzw. mit dem Ubi1-Promotor hybridisieren, verwendet.



**Abb. 26:** Southern Blot-Analyse von F<sub>1</sub>-Pflanzen (Kreuzung KG).

25 µg genomische DNA von F<sub>1</sub>-Nachkommen aus Kreuzungen der Eltern FRT 30-5 und FP 1-5A wurden zum Nachweis beider vollständigen Eltern-Transgene Act1::*flp* und Ubi.2FRT.*pat* **A** mit *XhoI/KspAI* und **B** mit *HindIII/EcoRI* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte **A** mit einem 1 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten *flp*-Fragment und **B** mit einem 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Fragment.

1-12 KG#1 bis #12 P Positivkontrollen (A: pAct1::*flp*; B: pUbi.2FRT.*pat*, je 30 pg)  
 E1 T<sub>0</sub>-Elter, maternal FRT 30-5 Wt Wildtyp A188  
 E2 T<sub>0</sub>-Elter, paternal FP 1-5A M Marker λ/Avall

In der F<sub>1</sub>-Generation traten Nachfahren auf, die nur eins der elterlichen Transgene trugen, z. B. konnte in KG#5 (Abb. 26; Spur 5) nur die Ubi.2FRT.*pat*-Kassette nachgewiesen werden, während KG#11 (Abb. 26; Spur 11) nur die *flp*-Kassette beinhaltete. KG#1 und 2 (Abb. 26; Spuren 1 und 2) enthielten dagegen keine Transgene; die auftretende Bande in Abbildung 26 B ist auf die verwendete Ubi1-Promotorsonde zurückzuführen, die ebenfalls das maisinterne Ubiquitin detektiert.

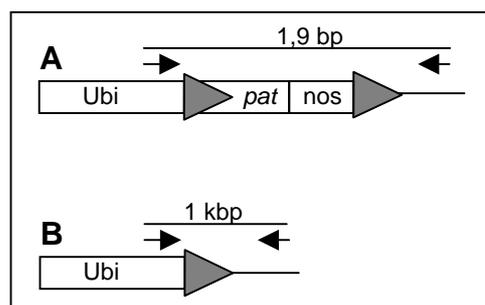
In einigen Nachkommen konnte sowohl das *flp*-Rekombinasegen, als auch die Ubi.2FRT.*pat*-Kassette nachgewiesen werden, wie in KG#3, #9, #10 und #12 (Abb. 26; Spuren 3, 9, 10 und 12). Auch wenn beide Komponenten des Rekombinationssystems Flp/FRT in diesen Pflanzen enthalten waren, so konnte doch keine Veränderung der Länge der Ubi.2FRT.*pat*-Kassette beobachtet werden, Im Gegensatz zu in Nachkommen von Kreuzungen zwischen cre- und lox-Linien.

### 5.3 Sequenzanalysen durch PCR

Das in den Southern Blot-Analysen von F<sub>1</sub>-Nachkommen der Kreuzungen K11 und K12 detektierte, 1,5 kbp lange Ubi1-Fragment kann durch Exzision des zwischen den loxP-*sites* befindlichen *pat*-Gens hervorgegangen sein. Um diese Rekombinationsereignisse zu verifizieren, wurde die Sequenz der Transgen-DNA aus den F<sub>1</sub>-Nachkommen mit der Sequenz der Eltern-DNA verglichen.

Um den Bereich der Erkennungssequenzen sequenzieren zu können, an dem die Rekombination stattfindet, wurde dieser Abschnitt in

einem PCR-Ansatz mit dem Primerpaar Ubifor und 18-rev-75 amplifiziert. Die Primer binden 943 bp stromaufwärts der 5' loxP Sequenz und 75 bp stromabwärts der 3' loxP Sequenz (Abb. 27). Als Template für die PCR diente genomische DNA von F<sub>1</sub>-Pflanzen, in denen im Southern Blot die 1,5 kbp Bande detektiert werden konnte (siehe Kapitel 5.2), die die um die Sequenz zwischen den loxP-*sites* verkürzte Transgenkassette darstellt.



**Abb. 27:** Schematische Darstellung nicht-rekombinierter DNA (A) und rekombinierter DNA (B).

Graue Dreiecke symbolisieren loxP-Sequenzen, schwarze Pfeile Primerbindungsstellen; die angegebenen Fragmentlängen resultieren aus der PCR mit dem Primerpaar Ubifor und 18-rev-75.

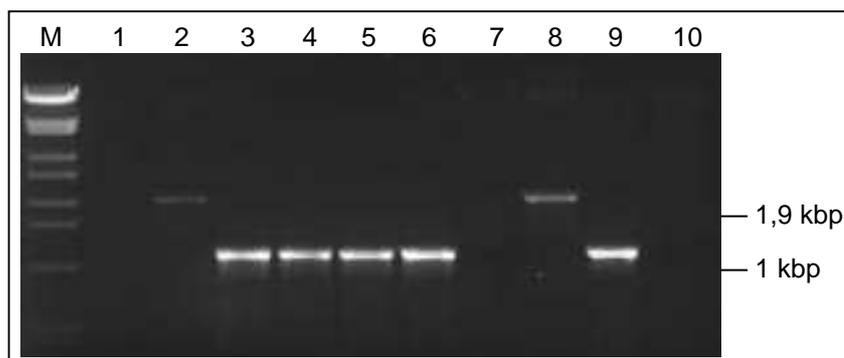
Abbildung 28 zeigt, dass die F<sub>1</sub>-Nachkommen, hervorgegangen aus den Kreuzungen K11 und K12, ein um etwa 900 bp kürzeres Fragment aufwiesen, als die dazugehörigen Eltern.

Dies entspricht der Länge des *pat*-Gens und dem *nos*-Terminator, die sich zwischen den *loxP*-sites befinden.

Die Amplifikate aus Eltern- und Nachkommen-DNA wurden sequenziert (Abb. 29).

Verglichen mit der Sequenz der Eltern-DNA wiesen alle Nachkommen eine Deletion

zwischen den beiden Erkennungsstellen auf. Nach der ersten *loxP*-site, schließen sich stromabwärts Sequenzen aus dem pUC-Rückgrat an. *pat*-Gen und *nos*-Terminator, sowie eine *loxP* Erkennungsstelle fehlen den F<sub>1</sub>-Nachkommen.



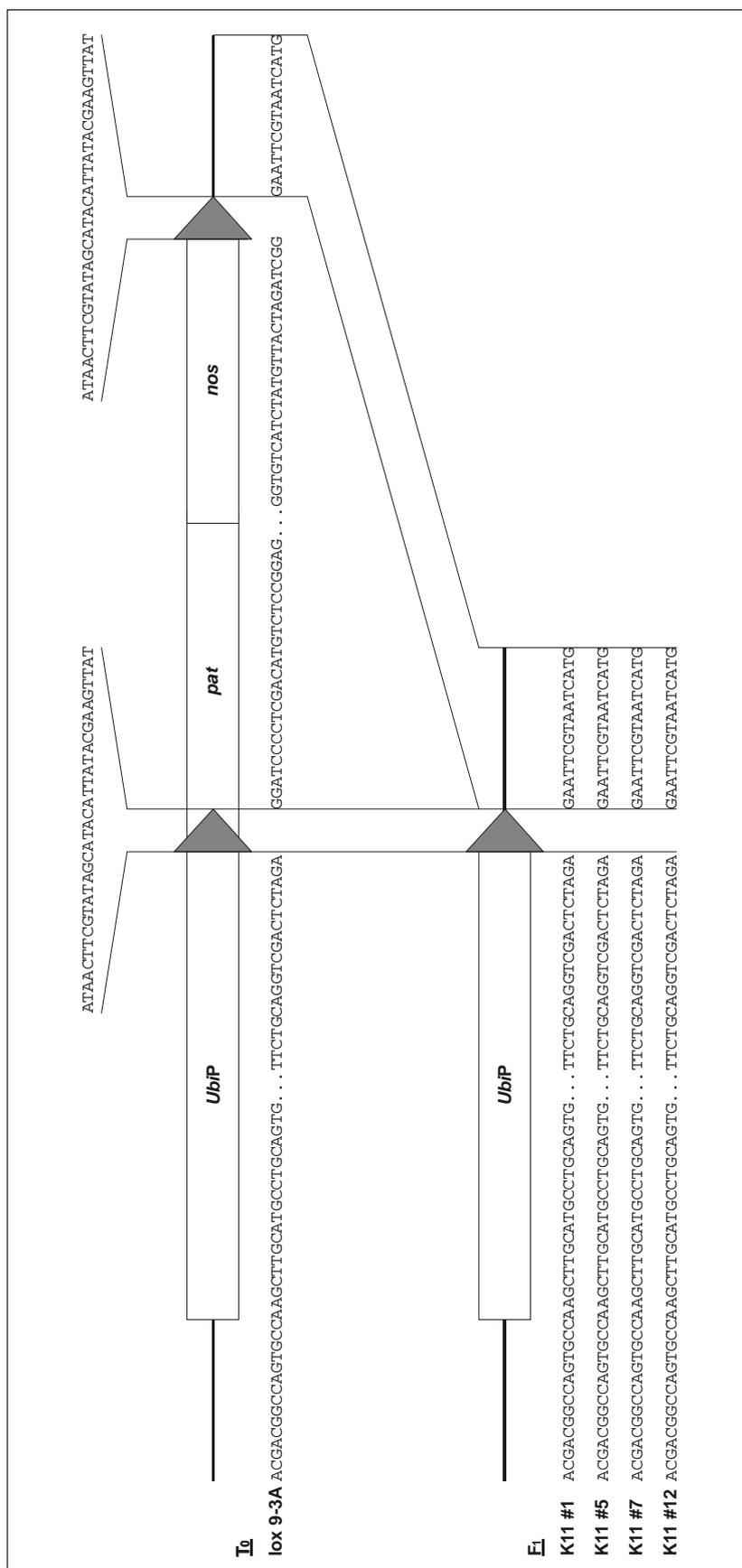
**Abb. 28:** PCR-Analyse von F<sub>1</sub>-Nachkommen und deren Eltern mit dem Primerpaar UbiFor und 18-rev-75 (siehe Abb. 27).

1 C 9-16, Elter	7 C 9-17, Elter
2 lox 9-3A, Elter	8 lox 9-3A, Elter
3 K11#1, F <sub>1</sub> -Nachkomme	9 K12#3, F <sub>1</sub> -Nachkomme
4 K11#5, F <sub>1</sub> -Nachkomme	10 Wildtyp A188
5 K11#7, F <sub>1</sub> -Nachkomme	M Marker, $\lambda$ /Styl
6 K11#12, F <sub>1</sub> -Nachkomme	

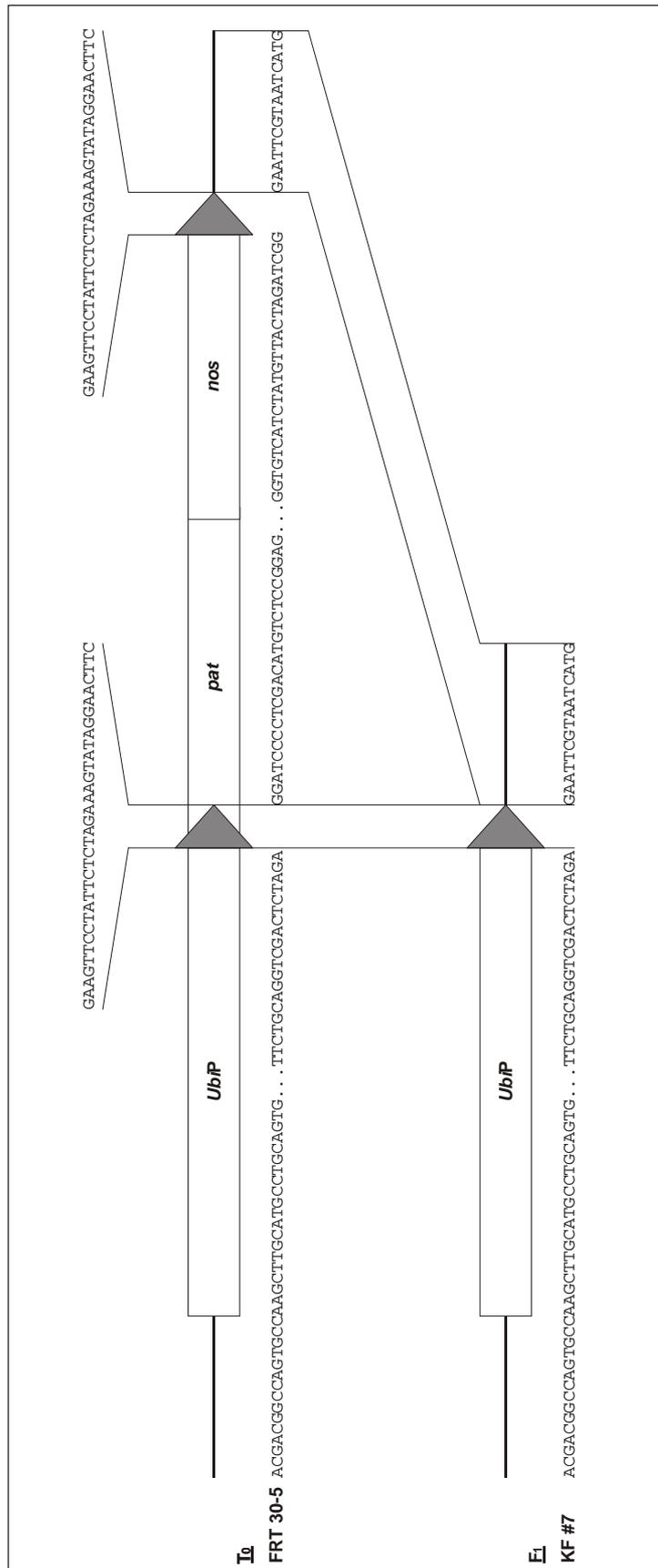
Obwohl in Kreuzungen zwischen *flp*- und FRT-tragenden Linien keine durch die Flp-Rekombinase vermittelte Veränderung des Bandenmusters nachgewiesen werden konnte, blieb durch das gemeinsame Auftreten von Rekombinase und FRT-sites in einer Pflanze trotzdem die Möglichkeit der Rekombination. Dies sollte in einem PCR-Ansatz geprüft werden. Es gelang, aus der DNA einer F<sub>1</sub>-Pflanze (Kreuzung KF) ein verkürztes FRT-Fragment zu amplifizieren. Dazu wurde das Produkt einer ersten PCR-Reaktion mit dem Primerpaar UbiFor und 18-rev-75 als Template für eine zweite PCR mit den gleichen Primern eingesetzt. So konnte genügend DNA für eine Sequenzierung amplifiziert werden.

Verglichen mit der Sequenz des PCR-Produktes aus der Eltern-DNA (Ubi.2FRT.*pat*) fehlte im Amplifikat des F<sub>1</sub>-Nachkommens die Sequenz zwischen den beiden FRT-Sequenzen einschließlich einer FRT-Sequenz (Abb. 30). Nach Ubi1-Promotor- und einer FRT-Sequenz schließen sich die Sequenzen an, die im elterlichen Genom erst stromabwärts des Terminators und der zweiten FRT-site folgen.

Die F<sub>1</sub>-Pflanzen, hervorgegangen aus der Kreuzung K11, K12 und KF, beinhalten also nachweislich nur noch eine *loxP*- bzw. FRT-Sequenz als Ergebnis einer erfolgreichen Rekombination durch die entsprechende Rekombinase. Diese Pflanzen konnten damit für Versuche zur gerichteten Integration von *loxP*- bzw. FRT-Fragmenten benutzt werden.



**Abb. 29:** Sequenzvergleich zwischen T<sub>0</sub>-Eltern-DNA (lox 9-3A) mit vollständiger Ubi.2lox.pat-Kassette und DNA von vier F<sub>1</sub>-Nachkommen (K11#1, 5, 7, 12), in denen sequenz-spezifische Rekombination zur Eliminierung der zwischen den loxP-sites gelegenen Sequenz führte. Graue Dreiecke markieren die 34 bp langen loxP-Erkennungssequenzen.



**Abb. 30:** Sequenzvergleich zwischen T<sub>0</sub>-Eltern-DNA (FRT 30-5) mit vollständiger Ubi.2FRT-,pat-Kassette und DNA vom F<sub>1</sub>-Nachkommen KF#7. Graue Dreiecke markieren die 34 bp langen FRT-Erkennungssequenzen.

## 6 Nachweis der Rekombination in der F<sub>2</sub>-Generation

### 6.1 Transiente Transformation

In 12 F<sub>1</sub>-Nachkommen von Kreuzungen zwischen *cre*- und *loxP*-Linien konnten sowohl die vollständige *cre*-Transgenkassette als auch genotypische Merkmale des *loxP*-Elters nachgewiesen werden. Letztere waren im Vergleich zum T<sub>0</sub>-Elter in der Hinsicht verändert, dass die vollständige Transgenkassette *Ubi.2lox.pat* nicht mehr detektiert werden konnte, stattdessen aber ein 1,5 kbp großes Fragment, das die um die Sequenz zwischen den *loxP-sites* verkürzte *Ubi.lox*-Kassette darstellt. In diesen Pflanzen verbleibt, resultierend aus der Cre-vermittelten sequenz-spezifischen Exzision, nur noch eine einzelne *loxP*-Sequenz. Transformation mit einem promotorlosen *lox.gus*-Konstrukt (*plox.gus*) mit einer gleichgerichteten Erkennungssequenz sollte zur *site*-spezifischen Integration des *gus*-Gens an der einzelnen *loxP-site* im Pflanzengenom stromabwärts vom *Ubi1*-Promotor führen. Dadurch kann das *gus*-Gen exprimiert und die Aktivität des Genproduktes, der  $\beta$ -Glukuronidase, durch einen GUS-Test visualisiert werden.

Um diese Rekombinationsfähigkeit nachzuweisen, wurden transiente Experimente durchgeführt. Embryonen von 6 *cre*-exprimierenden F<sub>1</sub>-Pflanzen, die sowohl maternale als auch paternale Transgene trugen und deutliche Hinweise auf Rekombinationsereignisse durch ein verkürztes, 1,5 kbp großes *Ubi1*-Fragment in Southern Blot-Analysen zeigten, wurden 17 Tage nach Selbstung isoliert und mit einem promotorlosen *lox.gus*-Konstrukt (*plox.gus*) beschossen. Nach drei Tagen wurde die  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität durch eine histochemische GUS-Färbung sichtbar gemacht und mithilfe eines Binokulars ausgewertet (Tab. 10).

Als Kontrolle für das Auftreten zufälliger Integrationen des promotorlosen *gus*-Gens in die Nähe von pflanzlichen Promotoren dienten einerseits gleich alte Embryonen aus dem Wildtyp-Hybrid A188 und H99, andererseits Embryonen aus den Elternpflanzen C 9-16 und *lox 9-3A*, die ebenfalls mit dem Konstrukt *plox.gus* transformiert wurden. Da diese Eltern jeweils nur eine Komponente des Rekombinationssystems enthalten, Rekombinase oder Erkennungssequenzen, waren keine gerichteten *gus*-Integrationsereignisse zu erwarten. Zusätzlich wurden als Positivkontrolle Wildtyp-Embryonen mit dem Plasmid *pUbi.gus* transformiert, welches nach zufälliger Integration zur konstitutiven Expression des *gus*-Gens führt.

**Tab. 10:** Auswertung des GUS-Tests von mit dem Plasmid *plox.gus* beschossenen Embryonen von F<sub>1</sub>-Nachkommen der Kreuzung K11 (C 9-16 X lox 9-3A).

Embryonen aus Selbstung von...	Embryonen / Anzahl Beschüsse	Signale insgesamt	Signal / Embryo
K11#22	43 / 3	1	0,02
K11#23	45 / 3	0	0
K11#24	18 / 1	0	0
K11#27	33 / 2	6	0,18
K11#28	68 / 4	19	<b>0,30</b>
K11#34	52 / 3	39	<b>0,75</b>
lox 9-3A-Elter (Ubi.2lox.pat)	67 / 4	2	0,03
C 9-16-Elter (Ubi::cre)	42 / 4	1	0,02
Wildtyp (A188 X H99)	21 / 1	3	0,14

Während alle Embryonen, die als Positivkontrolle mit *pUbi.gus* transformiert wurden, nach histochemischer GUS-Färbung mehr als 20 blaue Signale aufwiesen, traten Signale nach Transformation mit *plox.gus* auf den Kontrollembryonen nur vereinzelt auf (0,02 bis 0,14 Signale pro Embryo, Tab. 10). Auf transformierten Embryonen aus den geselbsteten F<sub>1</sub>-Nachkommen #28 und #34 der Kreuzung K11 konnten signifikant mehr Signale detektiert werden (0,30 und 0,75 Signale pro Embryo, Tab. 10), als auf den korrespondierenden Negativkontrollen. Embryonen aller weiteren F<sub>1</sub>-Nachkommen zeigten keine oder wenig blaue Signale, vergleichbar mit der Signalanzahl auf den Negativkontrollen (Tab. 10).

Neben der zum Teil geringen Anzahl an transformierten Embryonen, ist zur Bewertung dieses Versuchs die Segregation der Transgene zu berücksichtigen. Mendel zeigte, dass bei Nachkommen von Individuen, die sich in zwei Allelpaaaren unterscheiden (dihybride Kreuzung) Selbstung der F<sub>1</sub>-Pflanzen zur Aufspaltung des Phänotyps von 9:3:3:1 in der F<sub>2</sub>-Generation führt (zur Übersicht: Strickberger, 1988). Übertragen auf die während dieser Arbeit vollzogenen Kreuzungen von *cre*- und *loxP*-Linien (Tab. 11), tragen F<sub>2</sub>-Nachkommen, die aus der Selbstung der F<sub>1</sub>-Pflanzen hervorgegangen sind, zu

**Tab. 11:** Schema zur Vererbung der *cre*- und *loxP*-Transgene im dihybriden Erbgang in der F<sub>2</sub>-Generation.

Gameten	<i>cre loxP</i>	<i>cre y</i>	<i>x loxP</i>	<i>x y</i>
<i>cre loxP</i>	<b>cre loxP</b> <b>cre loxP</b>	<b>cre y</b> <b>cre loxP</b>	<b>x loxP</b> <b>cre loxP</b>	<b>x y</b> <b>cre loxP</b>
<i>cre y</i>	<b>cre loxP</b> <b>cre y</b>	<i>cre y</i> <i>cre y</i>	<b>x loxP</b> <b>cre y</b>	<i>x y</i> <i>cre y</i>
<i>x loxP</i>	<b>cre loxP</b> <b>x loxP</b>	<b>cre y</b> <b>x loxP</b>	<i>x loxP</i> <i>x loxP</i>	<i>x y</i> <i>x loxP</i>
<i>x y</i>	<b>cre loxP</b> <b>x y</b>	<i>cre y</i> <i>x y</i>	<i>x loxP</i> <i>x y</i>	<i>x y</i> <i>x y</i>

*x* und *y* stellen die den Transgenen entsprechenden Wildtyp-Allele dar.

56,25 % beide Transgene (*cre* und *loxP*). 43,75 % der Nachkommen beinhalten dagegen entweder nur eins der beiden Transgene oder entsprechen dem Wildtyp. Das bedeutet also, dass in den hier durchgeführten transienten Transformationstests nur 56,25 % der Embryonen tatsächlich die nötigen Komponenten des Rekombinationssystems enthielten, die eine gerichtete Integration ermöglichen. Vor diesem Hintergrund sind die Signalzahlen pro Embryo der transformierten transgenen Embryonen aus K11#28 und #34 höher einzustufen als die zufällige Integration von *plox.gus* in 100%ige Wildtyp-DNA.

Die in den transgenen Embryonen nachgewiesene  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität durch Integration des promotorlosen *plox.gus*-Konstruktes kann daher auf eine gerichtete Rekombination zurückzuführen sein.

Diese transienten Integrationsexperimente wurden in der gleichen Weise mit Embryonen geselbster  $F_1$ -Pflanzen durchgeführt, die aus der Kreuzung von *Act1::flp*- mit *Ubi.2FRT.pat*-Pflanzen hervorgegangen sind.

Obwohl im Kapitel 5.3 des Ergebnisteils gezeigt wurde, dass eine gerichtete Exzision der zwischen zwei FRT-Erkennungsstellen befindlichen *pat*-Sequenz stattfand, so dass eine einzelne FRT-Sequenz im pflanzlichen Genom verblieb, konnten nach Beschuss der Embryonen mit einem FRT.*gus*-Konstrukt und histochemischer GUS-Färbung keine blauen Signale beobachtet werden.

Da die bisherigen Ergebnisse mit dem Cre/*loxP*-System sehr vielversprechend ausgefallen sind, wurde auf Untersuchungen zum Rekombinationssystem Flp/FRT in der  $F_2$ -Generation vorerst verzichtet und das Augenmerk im folgenden auf die Arbeiten mit *cre*- und *loxP*-Linien gesetzt.

## 6.2 Southern Blot-Analysen

Ob die Häufigkeit, mit der Rekombinase und Erkennungssequenzen in den  $F_2$ -Nachkommen vorkommen, tatsächlich den Erwartungen entsprechen (siehe Tab. 11), wurde in Southern Blot-Analysen untersucht.

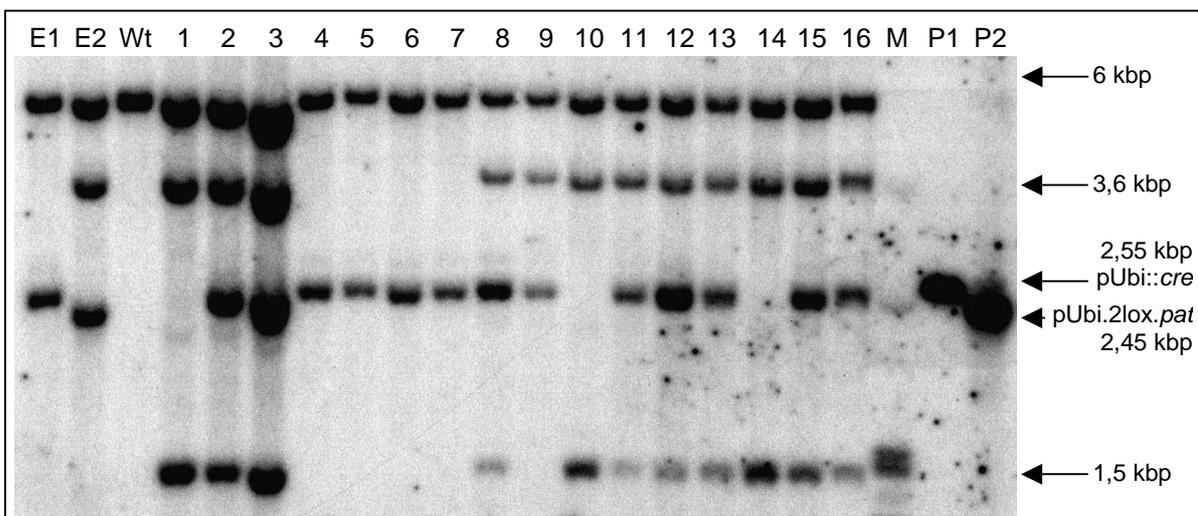
Aus 5  $F_1$ -Nachkommen mit *cre*- und *loxP*-Sequenzen, hervorgegangen aus den Kreuzungen K11 und K12, wurden nach Selbstung durch Isolierung und Kultivierung von 3 Wochen alten Embryonen auf MS-Regenerationsmedium Nachkommen regeneriert und anschließend molekular analysiert.

In Southern Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass F<sub>2</sub>-Nachkommen der Kreuzungen K11 und K12 ebenfalls maternale und paternale Transgene enthielten.

Nach *HindIII/EcoRI*-Verdau (zum Herausschneiden der vollständigen Transgenkassette) gab es aufgrund des Auftretens einer im Vergleich zum nicht-rekombinierten Elter verkürzten Ubi1-Bande (1,5 kbp) in einigen Pflanzen Hinweise auf Rekombinationsereignisse. Dieses 1,5 kbp lange Fragment entspricht der Länge der Transgenkassette nach Exzision des zwischen den *loxP-sites* befindlichen *pat*-Gens und des *nos*-Terminators.

Da die Herstellung von transgenen, *cre*-exprimierenden Pflanzen mit der gleichzeitigen Transformation mit dem Herbizidresistenzgen *pat* einherging, konnten die Nachkommen mit dem Phosphinothricin-haltigem Herbizid Basta<sup>®</sup> selektiert werden, obwohl durch erfolgreiche Rekombination das von *loxP-sites* umgebene Markergen *pat* entfernt wird. Bei dieser Selektion werden jedoch Pflanzen abgetötet, die durch Rekombination eine um das *pat*-Gen verkürzte Transgenkassette enthalten und aus denen die *cre*-Rekombinase mit dem co-transformierten *pat*-Selektionsmarkergen segregiert ist.

Nach Selektion mit dem Herbizid Basta<sup>®</sup> erwiesen sich 19 von 24 regenerierten Pflanzen, die aus der Selbstung von dem F<sub>1</sub>-Nachkommen K11#5 hervorgingen, als resistent.



**Abb. 31:** Southern Blot-Analyse von F<sub>2</sub>-Pflanzen.

25 µg genomische DNA von F<sub>2</sub>-Nachkommen, hervorgegangen aus K11#5 (dessen Eltern sind C 9-16 und lox 9-3A), wurden für die Bestimmung des Integrationsmusters mit *EcoRI/HindIII* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Ubi1-Fragment.

1 bis 16 K11#5 - 1 bis 16

E1 T<sub>0</sub>-Elter, maternal C 9-16

E2 T<sub>0</sub>-Elter, paternal lox 9-3A

Wt Wildtyp A188

P1 Positivkontrolle pUbi::*cre* (30 pg)

P2 Positivkontrolle pUbi.2lox.*pat* (30 pg)

M Marker λ/*Avall*

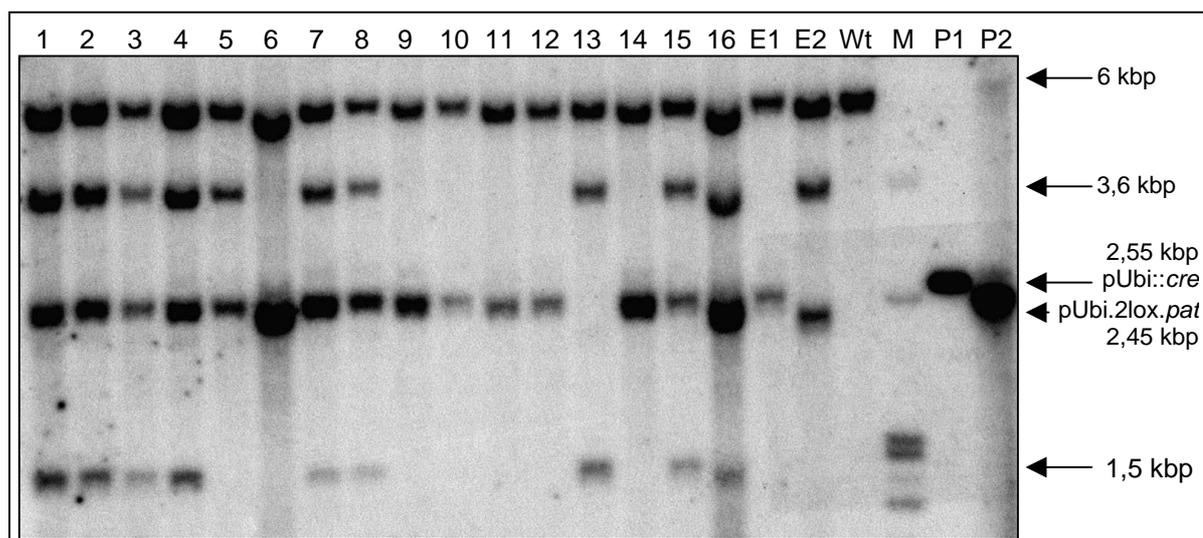
In der Analyse von 16 hier exemplarisch gezeigten Nachkommen von K11#5 konnten in 8 Nachkommen Merkmale des paternalen und maternalen Elterngenoms detektiert werden (Abb. 31; Spuren 2, 3, 8, 11, 12, 13, 15 und 16). In allen Nachkommen konnte ebenfalls die

durch Exzision verkürzte Transgenkassette mit einer Länge von 1,5 kbp nachgewiesen werden, die auch schon in der F<sub>1</sub>-Generation auftrat.

Eine Ausnahme bildet der Nachkomme 9 (Abb. 31; Spur 9). Neben der 2,55 kbp langen Bande des *cre*-Transgens konnte auch die für den *lox*-Elter typische, 3,6 kbp lange Bande nachgewiesen werden, jedoch weder die nach erfolgreicher Rekombination auftretende 1,5 kbp langen Bande, noch die ursprünglichen 2,45 kbp langen Bande (*Ubi.2lox.pat*). Dies könnte auf eine ungekoppelte Vererbung der verschieden langen *loxP*-Transgene deuten.

4 Nachkommen beinhalteten nur das für den *cre*-Elter typische Muster (Abb. 31; Spuren 4 bis 7), während 3 weitere nur *loxP*-typische, und damit dem paternalen Elter entsprechende Banden zeigten (Abb. 31; Spuren 1, 10 und 14). Diesen 3 Nachfahren fehlte die Bande einer Größe von 2,45 kbp aus dem typischen Muster des *lox*-Elters, die der vollständigen Größe des *Ubi.2lox.pat*-Transgens entsprach. Jede dieser Pflanzen wies jedoch stattdessen ein 1,5 kbp langes *Ubi1*-Fragment auf, das der Transgenkassette nach Exzision des zwischen den *loxP*-sites befindliche *pat*-Gen entspricht und damit einen Hinweis auf erfolgreiche Rekombination gibt.

Unter den 38 regenerierten F<sub>2</sub>-Nachkommen von K11#7 waren 22 Basta<sup>®</sup>-resistent. Nach Southern Blot-Analysen von 16 hier abgebildeten Nachfahren zeigten 8 sowohl das *cre*-Transgen als auch *loxP*-typische Banden (Abb. 32; Spuren 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 und 16). Alle Nachkommen wiesen statt des 2,45 kbp langen Fragments, das der Länge der vollständigen



**Abb. 32:** Southern Blot Analyse von F<sub>2</sub>-Pflanzen.

25 µg genomische DNA von F<sub>2</sub>-Nachkommen, hervorgegangen aus K11#7 (dessen Eltern sind C 9-16 und *lox* 9-3A), wurden für die Bestimmung des Integrationsmusters mit *EcoRI/HindIII* restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 1,5 kbp [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten *Ubi1*-Fragment.

1 bis 16	K11#7 - 1 bis 16	P1	Positivkontrolle pUbi:: <i>cre</i> (30 µg)
E1	T <sub>0</sub> -Elter, maternal C 9-16	P2	Positivkontrolle pUbi.2lox. <i>pat</i> (30 µg)
E2	T <sub>0</sub> -Elter, paternal <i>lox</i> 9-3A	M	Marker $\lambda$ Avall
Wt	Wildtyp A188		

Ubi.2lox.*pat*-Kassette entspricht, ein 1,5 kbp langes Fragment auf, das auf eine erfolgreiche Exzision des zwischen loxP-Sequenzen liegenden *pat*-Gens deutet.

Merkmale beider Eltern zeigte auch der Nachkomme 5 (Abb. 32; Spur 5), der neben der *cre*-Bande von 2,55 kbp auch die für den lox-Elter typische Bande der Größe 3,6 kbp trug. Das Fehlen der 2,45 kbp großen (Ubi.2lox.*pat*-Kassette) bzw. im Falle einer erfolgreichen Rekombination nachzuweisenden 1,5 kbp langen Bande könnte auf eine ungekoppelte Vererbung der loxP-Transgene hinweisen.

6 Pflanzen beinhalteten nur das maternale *cre*-Transgen (Abb. 32; Spuren 6, 9, 10, 11, 12 und 14), während ein Nachkomme nur paternale Merkmale aufwies (Abb. 32; Spur 13). Diesem fehlte die 2,45 kbp große Bande des lox-Elters, zeigte aber ein 1,5 kbp-Fragment als Zeichen für eine gelungene Exzision des loxP-flankierten *pat*-Gens.

Aus der F<sub>1</sub>-Generation K12#3 konnten 42 Pflanzen regeneriert werden. Nach Basta<sup>®</sup>-Selektion wurden die verbleibenden, resistenten 39 Pflanzen in Southern Blot-Analysen untersucht. 6 Nachkommen zeigten sowohl das *cre*-Transgen des paternalen Elters als auch Merkmale des loxP-tragenden maternalen Elters. Alle wiesen eine 1,5 kbp große Bande auf, die auch schon in der F<sub>1</sub>-Generation (K12#3) auftrat und als Hinweis für eine gerichtete Rekombination dient.

Die 1,5 kbp lange Bande als Zeichen für die gelungene Exzision der zwischen den loxP-sites befindlichen Sequenz konnte ebenfalls in 5 Nachkommen nachgewiesen werden, die jedoch keine *cre*-Rekombinasegene trugen.

### 6.3 Analyse zur Segregation der Transgene in der F<sub>2</sub>-Generation

Um die Segregation der Transgene zu überprüfen, wurden sämtliche F<sub>2</sub>-Nachfahren von zwei F<sub>1</sub>-Pflanzen (K11#1 und K11#12) ohne vorherige Selektion molekular analysiert.

Die 21 F<sub>2</sub>-Nachkommen der geselbsteten F<sub>1</sub>-Pflanze K11#1 wurden in Southern Blot-Analysen untersucht. Während Restriktion mit *HindIII/EcoRI* wurden die ganzen Transgenkassetten sowohl des *cre*-Gens als auch der loxP-Transgene herausgeschnitten. Durch Hybridisierung mit einer die beiden Transgene detektierenden Ubi1-Sonde konnten die Genotypen der Nachkommen identifiziert werden.

In 10 Pflanzen (47,1 %) traten sowohl mütterliche als auch väterliche Transgene auf. Nach den Mendelschen Gesetzen zur Vererbung waren 56,25 % zu erwarten. 3 Nachfahren, und damit 14,3 % enthielten ausschließlich loxP-Transgene, während ein Anteil von 18,75 % zu

erwarten war. Weitere 5 Pflanzen (23,8 %) konnten dem Genotyp des *cre*-Elters zugeordnet werden. Auch hier war ein prozentualer Anteil von 18,75 % zu erwarten. 3 Nachkommen enthielten keine Transgene (14,3 %) und entsprachen damit dem Wildtyp-Genotyp, obwohl ein theoretischer Anteil von 6,25 % zu erwarten war.

Tabelle 12 zeigt die theoretische und in K11#1 und K11#12 tatsächliche Segregation der Transgene auf.

**Tab. 12:** Übersicht über die theoretische und tatsächliche Vererbung der Genotypen in den F<sub>2</sub>-Pflanzen aus K11#1 und K11#12

<b>Genotyp</b>	<b>Theoretischer, prozentualer Anteil</b>	<b>Tatsächlicher, prozentualer Anteil in K11#1-Nachkommen (21 Pflanzen)</b>	<b>Tatsächlicher, prozentualer Anteil in K11#12-Nachkommen (33 Pflanzen)</b>
Wildtyp	6,25	14,3	18,2
<i>cre</i>	18,75	23,8	21,2
loxP	18,75	14,3	6,1
<i>cre</i> / loxP	56,25	47,6	54,5

Um zu überprüfen, ob das tatsächliche Auftreten der Transgene in den Nachkommen mit den Erwartungen der Vererbung im dihybriden Erbgang übereinstimmt, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt (zur Übersicht: Strickberger, 1988). Dabei wurden Erwartungswerte für die Segregation der 4 Genotypen (*cre*, loxP, *cre*+loxP, Wt) laut Mendelscher Gesetze errechnet und daraufhin festgestellt, wie gut die tatsächlich nachgewiesenen Ergebnisse mit den erwarteten übereinstimmen.

Für einen Freiheitsgrad von 3 ist die Wahrscheinlichkeit für den berechneten Chi-Quadrat-Wert von 2,96 mehr als 95 %. Die Erwartungen stimmen also innerhalb einer allgemein anerkannten Signifikanzschwelle von 5 % mit den tatsächlichen Beobachtungen überein.

33 F<sub>2</sub>-Nachkommen von K11#12 wurden in der gleichen Weise analysiert.

In 18 Pflanzen (54,5 %) traten sowohl mütterliche als auch väterliche Transgene auf, was dem theoretisch zu erwartendem Anteil von 56,25 % nahe kommt. 2 Nachfahren, und damit 6,1 % enthielten ausschließlich loxP-Transgene. Nach Mendel waren 18,75 % zu erwarten. Weitere 7 Pflanzen (21,2 %) konnten dem Genotyp des *cre*-Elters zugeordnet werden. Auch hier war ein prozentualer Anteil von 18,75 % zu erwarten. Während 6 Nachkommen keine Transgene enthielten (18,2 %) und damit dem Wildtyp-Genotyp entsprachen, war laut Mendel eine statistische Häufigkeit dieses Genotyps von nur 6,25 % zu erwarten.

Die statistische Prüfung ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 10,47. Nur in weniger als 1 % ist anzunehmen, dass die Erwartungen mit den Beobachtungen übereinstimmen. Da die Abweichungen signifikant sind, ist die Hypothese, dass die Transgene nach den Mendelschen Gesetzen in einem dihybriden Erbgang segregieren, abzulehnen.

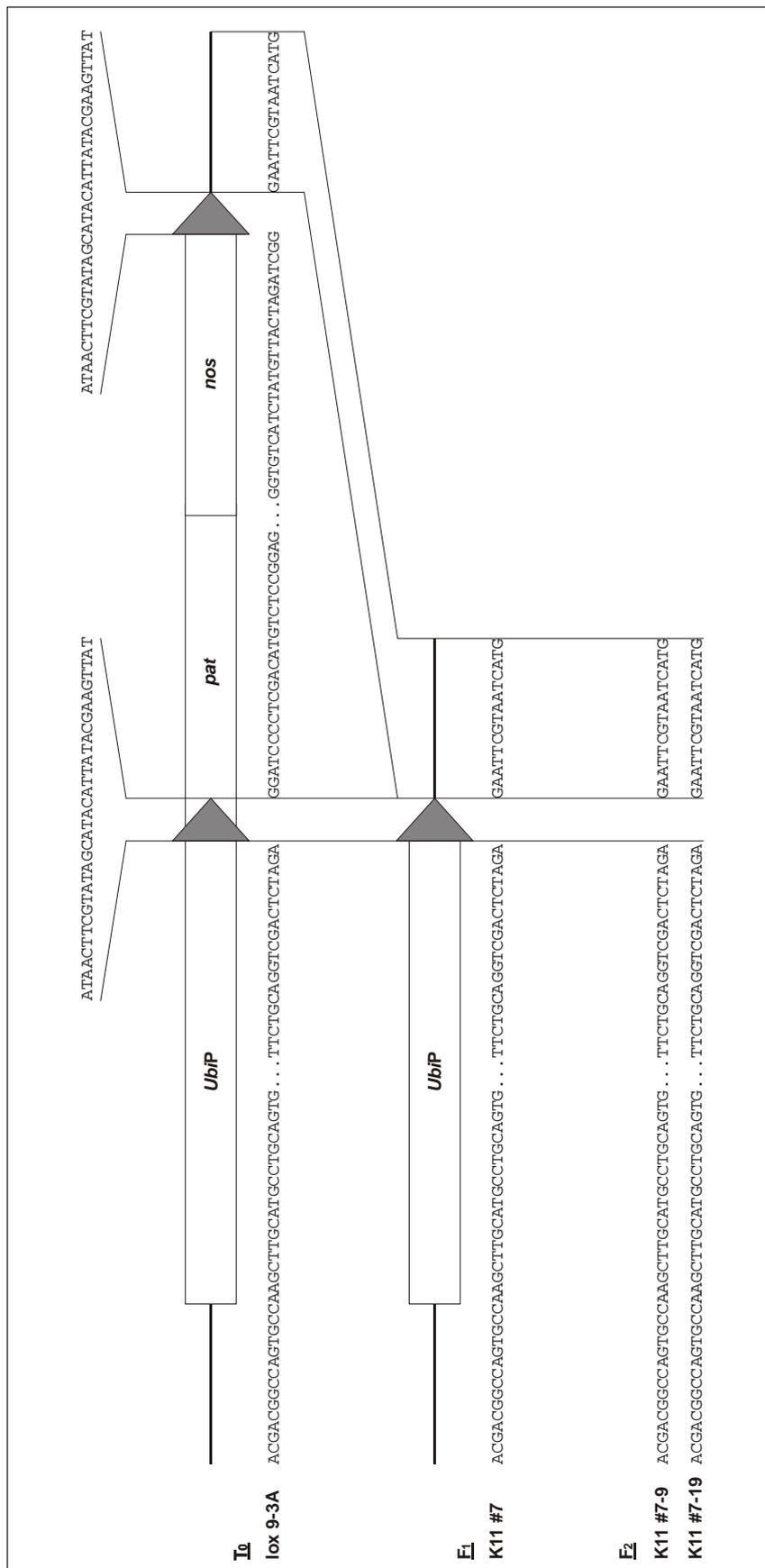
Da die Stichprobenanzahl vermutlich nicht ausreichend war, sind Wiederholungen der Versuche mit mehr Nachkommen nötig, um die Segregation der Transgene statistisch abzusichern zu können,

#### **6.4 Sequenzanalysen durch PCR**

Das in den Southern Blot-Analysen von F<sub>1</sub>-Nachkommen detektierte, 1,5 kbp lange Ubi1-Fragment trat ebenfalls in der F<sub>2</sub>-Generation auf. Um zu verifizieren, dass es sich bei diesem Fragment um die gleiche Sequenz handelt, die in der F<sub>1</sub>-Generation aus der Exzision der zwischen den *loxP-sites* gelegenen Sequenz hervorging, wurde die Sequenz der Transgen-DNA aus den F<sub>2</sub>-Nachkommen mit der der Eltern-DNA (F<sub>1</sub>-Generation) verglichen.

Um den Bereich der Erkennungssequenzen, an dem die Rekombination stattfand, sequenzieren zu können, wurde dieser Abschnitt wie in Kapitel 5.3 des Ergebnisteils in einem PCR-Ansatz mit dem Primerpaar Ubifor und 18-rev-75 amplifiziert. Als Template für die PCR diente genomische DNA von exemplarisch ausgewählten F<sub>2</sub>-Pflanzen, in denen im Southern Blot die 1,5 kbp Bande als Hinweis für eine gelungene Exzision auftrat.

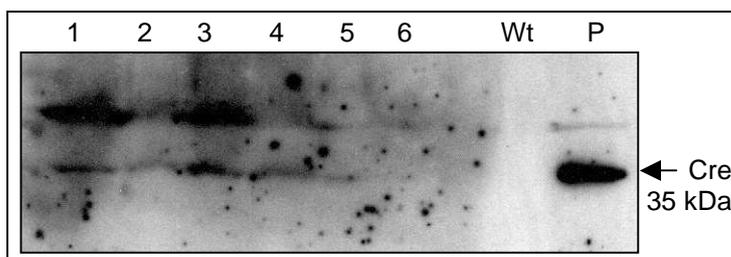
In diesen F<sub>2</sub>-Nachkommen zeigte ein circa 1 kbp großes Fragment dieselbe Länge, wie schon in der PCR-Analyse von DNA der F<sub>1</sub>-Pflanzen (siehe Ergebnisse Kapitel 5.3, Abbildung 28). Die Amplifikate wurden sequenziert. Abbildung 33 zeigt zwei Sequenzen aus F<sub>2</sub>-Nachfahren im Vergleich mit der Sequenz der F<sub>1</sub>- und T<sub>0</sub>-Pflanze. Die Nachkommen wiesen die gleiche Deletion zwischen den beiden Erkennungsstellen auf und hatten somit die gleiche Sequenz wie die F<sub>1</sub>-Pflanze, aus der sie hervorgingen.



**Abb. 33:** Sequenzvergleich zwischen T<sub>0</sub>-Pflanzen-DNA (*lox* 9-3A) mit vollständiger *Ubi.2lox.pat*-Kassette, DNA der elterlichen F<sub>1</sub>-Pflanze (K11#7), in denen sequenz-spezifische Rekombination zur Eliminierung der zwischen den *loxP*-sites gelegenen Sequenz nachgewiesen wurde, und DNA zweier F<sub>2</sub>-Nachkommen (K11#7-9 und 19). Graue Dreiecke markieren die 34 bp langen *loxP*-Erkennungssequenzen.

## 6.5 Cre-Nachweis in der F<sub>2</sub>-Generation

Um die Veränderung des DNA-Bandenmusters in den Nachkommen auf die Aktivität der Rekombinase zurückführen zu können, wurden mit Cre/loxP-Nachfahren der F<sub>2</sub>-Generation Western Blot-Analysen durchgeführt, um die Rekombinase Cre nachzuweisen. Exemplarisch wurde Gesamtprotein von zwei Pflanzen jeder F<sub>2</sub>-Generation analysiert. In mindestens einer dieser zwei Pflanzen konnte das Cre-Protein nachgewiesen werden. Abbildung 34 zeigt



**Abb. 34:** Nachweis des Cre-Proteins durch Western Blot-Analyse in F<sub>2</sub>-Pflanzen. Gesamt-Protein aus Blättern von T<sub>0</sub>-Pflanzen und untransformierten Wildtyp (A188) wurden analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Cre-Antikörper.

1	K11#1-6	5	K11#7-3
2	K11#1-15	6	K11#7-22
3	K11#5-8	Wt	Wildtyp
4	K11#5-11	P	Positivkontrolle

exemplarisch 6 F<sub>2</sub>-Nachkommen. Durch den Vergleich mit einer Cre-Positivkontrolle (bereitgestellt von Dr. L. Kopertekh, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig) konnte in den Blattextrakten transgener Maispflanzen Cre-Protein identifiziert werden. Es konnte in beiden untersuchten F<sub>2</sub>-Nachkommen von K11#1 und K11#5 Cre-Protein der richtigen

Größe von 35 kDa nachgewiesen werden (Abb. 34, Spur 1 bis 4); ebenso wie in einer der beiden analysierten K11#7-Probe (Abb. 34, Spur 5).

Das Fehlen einer Cre-Protein repräsentierenden Bande im F<sub>2</sub>-Nachkommen K11#7-22 (Abb. 34; Spur 6) könnte auf eine geringe Sensitivität des Cre-Antikörpers zurückzuführen sein.

## 6.6 Nachweis der Rekombination in Nachkommen von F<sub>2</sub>-Pflanzen

Wie in Ergebniskapitel 6.1, Tabelle 11 gezeigt, traten *cre*- und *loxP*-Transgene in etwa der Hälfte aller Nachkommen in der F<sub>2</sub>-Generation auf. Nachfahren dieser Pflanzen könnten diesen Anteil stabilisieren und sogar erhöhen. Im Falle von homozygoten *cre/loxP*-Pflanzen bestünde gar die Möglichkeit zur Uniformität der Nachkommen in der F<sub>3</sub>-Generation.

Daher wurden Embryonen, die aus der Selbstung von F<sub>2</sub>-Pflanzen mit beiden Komponenten des Rekombinationssystems Cre/loxP hervorgingen, in transienten Versuchen zur gerichteten Integration einer promotorlosen *lox.gus*-Sequenz biolistisch mit dem Konstrukt *plox.gus* transformiert. Nach *site*-spezifischer Integration der *lox.gus*-Sequenz an einer *loxP-site* in der Pflanzen-DNA, die sich stromabwärts des Ubi1-Promotors befindet, sollte das *gus*-Gen exprimiert und die  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität durch einen GUS-Test nachgewiesen werden. Die in den transgenen Embryonen beobachteten Signalzahlen sollten mit als

Negativkontrolle ebenfalls mit dem promotorlosen *lox.gus*-Konstrukt transformierten Wildtyp-Embryonen verglichen werden. In letzteren wird  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität nur durch zufällige Integration des *gus*-Gens stromabwärts eines pflanzlichen Promotors ermöglicht.

Erste vorläufige Beobachtungen von transient transformierten Embryonen, die vermeintlich sowohl das *cre*-Transgen als auch *loxP-sites* tragen, zeigten Signalzahlen von bis zu 0,125 pro Embryo. Dem gegenüber wiesen derart transformierte Wildtyp-Embryonen durchschnittlich 0,04 Signale pro Embryo auf.

Zusätzlich wurden transgene Embryonen beschossen, deren Eltern nur eine *loxP*-Sequenz beinhalteten, aber kein *cre*-Transgen mehr trugen. Neben dem Konstrukt *plox.gus* wurden diese Embryonen zusätzlich mit dem Plasmid *pUbi::cre* transformiert, das die Expression der *cre*-Rekombinase verursacht. Auch die Signalzahlen solcher Embryonen waren mit bis zu 0,56 Signalen pro Embryo höher als die zum Vergleich mit denselben Konstrukten transformierten Wildtyp-Embryonen (0,037 Signale pro Embryo).

Da aber in den bisherigen Versuchen zu wenig Embryonen transformiert wurden, ist eine endgültige Aussage noch nicht zu treffen und die Versuche mit einer hohen Stückzahl zu wiederholen. Des Weiteren ist die Konzentration auf homozygote Linien ratsam, da diese Transgensequenzen zuverlässig vererben. Die schon in diesen transienten Versuchen sich abhebende Tendenz zur gerichteten Integration kann durch die Nutzung homozygoter Linien validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten sequenz-spezifische Rekombinationen in Mais nachgewiesen werden. Sowohl *in vitro* als auch in transient transformierten Weizenembryonen konnten Exzision und Integration aufgezeigt werden. Durch Kombination von Rekombinase und Erkennungssequenzen in stabil transformierten Maispflanzen konnten Exzisionsereignisse nachgewiesen und Hinweise auf Integrationen gegeben werden.

**E Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden sequenz-spezifische Rekombinationen in Mais untersucht. Dazu wurden das prokaryotische Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 und das eukaryotische Rekombinationssystem Flp/FRT aus Hefe verwendet.

Beginnend mit *in vitro*- und transienten Experimenten wurde untersucht, ob diese Rekombinationssysteme Rekombinationsreaktionen in monokotylen Pflanzenzellen vermitteln. Nach stabiler Transformation von Mais mit Erkennungssequenzen bzw. Rekombinasegenen, wurden nach Kombination der beiden Komponenten der Rekombinationssysteme durch Kreuzung sequenz-spezifische Rekombinationen in den Nachkommen analysiert.

## 1 Sequenz-spezifische Exzision

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Funktionalität des Rekombinationssystems Cre/loxP durch *in vitro*-Tests nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Kapitel 2). Nach Inkubation von loxP-tragenden Plasmiden mit einer Cre-Rekombinase konnten Rekombinationsereignisse, wie Exzision und Integration, durch einen PCR-Ansatz dargestellt werden. Ebenso zeigten die Ergebnisse transients Transformationen erfolgreiche Rekombinationsereignisse. Nach Beschuss von monokotylen Gewebe mit Erkennungssequenzen und Rekombinasegenen konnten durch die Integration eines promotorlosen *gus*-Konstruktes, das zusätzlich eine Erkennungssequenz trug, sequenz-spezifische Rekombinationen nachgewiesen werden. Es konnten sowohl mit dem Rekombinationssystem Cre/loxP als auch mit dem Flp/FRT-System gerichtete Rekombinationen vermittelt und nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Kapitel 3.1 und 3.2). Die in dieser Arbeit hergestellten Komponenten der Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT sind demnach in monokotylen Pflanzenzellen funktionell. Dazu ist eine exakte Übereinstimmung der Sequenzen, besonders in der 8 bp langen Spacer-Region, unerlässlich. So konnten Hoess *et al.* (1987) durch verschiedene Veränderungen in der Spacer-Region der lox-*site* zeigen, dass ein Basenaustausch an bestimmten Positionen im Spacer nur Rekombinationen mit ebenso mutierten lox-*sites* zulässt oder sogar vollständig verhindert.

Selbstverständlich ist auch die akkurate Expression der Rekombinasen unentbehrlich für das Funktionieren der Rekombinationssysteme. Neben der Einhaltung des Leserahmens ist besonders der C-Terminus der Rekombinasen essentiell für die Funktionalität der Enzyme (Wierzbicki *et al.*, 1987). Die Enzyme Cre und Flp gehören zur Gruppe der Tyrosin-Rekombinasen. Wird das sich im C-terminalen Bereich der Cre-Rekombinase an Position 324 befindende Tyrosin mutiert, kann zwar noch eine Bindung der Cre an die Erkennungssequenz stattfinden, jedoch keine Strangöffnung. Auch die katalytische Funktion

der Flp-Rekombinase wird durch die Veränderung des konservierten Tyrosins negativ beeinflusst (Evans *et al.*, 1990).

Sequenzgenaue Konstrukte und deren Expression sind daher Voraussetzungen für erfolgreiche Rekombinationen und konnten durch diese Arbeit bestätigt werden.

Um sequenz-spezifische Rekombination auch *in planta* anwenden zu können, wurden während dieser Arbeit stabile Transformationen von Mais durchgeführt (siehe Ergebnisse Kapitel 4). Unreife Maisembryonen wurden jeweils mit von gleichgerichteten Erkennungssequenzen (loxP, FRT) flankierten Markergenen bzw. mit Rekombinasegenen (*cre*, *flp*) transformiert. Nach Kreuzung von Rekombinase-Pflanzen mit Pflanzen, die zwei in die gleiche Richtung orientierte Erkennungssequenzen tragen, wurden in F<sub>1</sub>-Nachkommen sequenz-spezifische Deletionen des Markergens nachgewiesen (siehe Ergebnisse Kapitel 5.2 und 5.3). Zum einen wurde in Southern Blot-Analysen untersucht, ob sich das Bandenmuster genomischer DNA aus F<sub>1</sub>-Pflanzen durch Rekombination veränderte, zum anderen wurde durch einen PCR-Ansatz die Bestimmung der Sequenz der rekombinierten DNA ermöglicht. Beim Nachweis der vollständigen, 2,45 kbp langen Ubi.2lox.pat.nos-Transgenkassette in Southern Blot-Analysen zeigten F<sub>1</sub>-Pflanzen statt dieser eine um die Sequenz zwischen den loxP-sites kürzere, 1,5 kbp lange Bande (siehe Ergebnisse Kapitel 5.2, Abb. 24 und 25). Die Sequenzierung dieses Bereiches stützte das Auftreten von sequenz-spezifischen Deletionen. Sowohl in F<sub>1</sub>-Nachkommen aus Kreuzungen zwischen *cre*- und loxP-Linien als auch von *flp*- mit FRT-Linien konnten dadurch Exzisionsereignisse nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Kapitel 5.3, Abb. 29 und 30).

Die Methode der Kreuzung zur Kombination von Rekombinase und Erkennungssequenzen wurde und wird seit der Anwendung von Rekombinationssystemen in Pflanzen eingesetzt. Durch Kreuzung von *cre*- und lox-tragenden Pflanzen konnten bei Tabak (Odell *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 1994), Weizen (Srivastava *et al.*, 1999), Mais (Zhang *et al.*, 2003) und Reis (Hoa *et al.*, 2002) sequenz-spezifische Exzisionsereignisse nachgewiesen werden. Gleichfalls führten Kreuzungen von *flp*- und FRT-tragenden Tabak- (Lloyd und Davis, 1994) oder *Arabidopsis thaliana*- (Kilby *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2000) Pflanzen zur erfolgreichen Rekombination in den Nachkommen.

Alternativ führt auch Re-Transformation zur Kombination der beiden Komponenten der Rekombinationssysteme. Durch Re-Transformation von Erkennungssequenzen-tragenden Pflanzen mit dem Rekombinasegen konnte die durch die Rekombinase katalysierte Reaktion ermöglicht werden, wie in Tabak von Odell *et al.* (1990), Russell *et al.* (1992) und Gleave *et al.* (1999) nachgewiesen.

Die während dieser Arbeit verwendete Methode zur Amplifizierung der Sequenz der Rekombinationsorte durch PCR konnte exakt die erwartete Sequenz nach Exzision der

---

zwischen den Erkennungssequenzen befindlichen DNA aufzeigen (siehe Ergebnisse Kapitel 5.3). Mit ähnlichen PCR- und Sequenzierungsansätzen konnten z. B. auch Corneille *et al.* (2001) in Tabakplastiden, Zhang *et al.* (2003) in Mais, Mlynarova und Nap (2003) und Kopertekh *et al.* (2004) in Tabakpflanzen Exzisionsereignisse nachweisen.

Die sequenz-spezifische Deletion trat ausnahmslos in den Nachkommen auf, die maternale und paternale Transgensequenzen beinhalten. Es gab unter 80 untersuchten Nachkommen keine, die das *cre*-Rekombinasegen und ein nicht-rekombiniertes *Ubi.2lox.pat*-Transgen trugen. Dies deutet auf eine sehr hohe Effizienz des Cre/loxP-Rekombinationssystems hin. Auch in Tabak und *Arabidopsis* beobachteten Russell *et al.* (1992) eine hohe Effizienz von 95 % bei der Eliminierung eines von loxP-sites flankierten Markergens. Odell *et al.* (1990) konnten Cre-vermittelte Exzisionsraten im Tabakgenom von bis zu 100 % nachweisen.

Dass die in dieser Arbeit beobachtete Effizienz der Eliminierung durch das Cre/loxP-System 100%ig zu sein scheint, weist auf eine sehr früh stattfindende Rekombination hin. Würde die sequenz-spezifische Reaktion erst somatisch stattfinden, hätten nicht alle Pflanzenzellen rekombinierte, verkürzte Transgen-DNA gezeigt. In Southern Blot-Analysen wäre demnach auch nicht-rekombinierte DNA nachzuweisen. Den in dieser Arbeit 12 untersuchten Pflanzen, die sequenz-spezifische Deletionen aufwiesen, fehlten einheitlich nicht-rekombinierte Transgenkassetten. Natürlich kann die Anzahl der Stichproben für eine zeitliche Aussage der Rekombinationsereignisse zu gering sein, aber auch die Versuche zur Cre-vermittelten Eliminierung eines loxP-flankierten Resistenzgens von Russell *et al.* (1992) deuteten auf eine sehr früh in der Entwicklung erfolgenden Exzision, denn alle Nachkommen waren sensitiv gegenüber der Selektionsreagenz, enthielten also, anders als die T<sub>0</sub>-Pflanzen, keinen Resistenzmarker mehr. Ebenfalls aufgrund der in allen Nachkommen fehlenden Enzymaktivität der lox-flankierten Luziferase schlossen Bayley *et al.* (1992) auf eine früh stattfindende Rekombination.

Im Gegensatz dazu beobachteten Srivastava und Mitarbeiter in einigen Pflanzen unvollständige Rekombinationen. Zur Eliminierung zusätzlicher Transgenkopien nutzten sie in Weizen (Srivastava *et al.*, 1999; 2003) und Mais (Srivastava und Ow, 2001) das Cre/lox-System. Da bei der biolistischen Transformation häufig mehrere, tandemartig angeordnete Kopien der Transgene ins Genom integrieren (Wakita *et al.*, 1998; Breitler *et al.*, 2002; Pawlowski und Somers, 1998; Svitashv *et al.*, 2002), konnten diese multiplen, mit lox-Sequenzen flankierten Transgenkopien durch Cre-vermittelte Rekombination aufgelöst und damit funktionale und strukturelle Instabilitäten vermieden werden. Zudem erfordert auch die

kommerzielle Nutzung von transgenen Pflanzen das Vorliegen des Transgens in Einzelkopie. Nicht alle Nachkommen zeigten das erwartete, singuläre Auftreten des Transgens, was eine unvollständige Exzision belegt. Srivastava und Mitarbeiter vermuteten genetische oder epigenetische Veränderungen der *cre*-Expression; eine späte Expression könnte zu unvollständigen Exzisionen in der späten Entwicklung geführt haben.

Unterstützend sind die Ergebnisse von Mlynarova und Nap (2003), die eine geringere Effizienz des Cre/loxP-Systems bei konstitutiver Expression der *cre*-Rekombinase in Tabak beobachteten. Dagegen führte die transiente *cre*-Expression zur effizienten und präzisen Exzision.

Da durch Rekombinase-vermittelte Exzision wiederum gleichgerichtete Erkennungssequenzen generiert werden, besteht die Möglichkeit zur reversiblen Reaktion, der Integration, obwohl diese Rückreaktion kinetisch ungünstig ist. Die in dieser Arbeit hervorgegangenen F<sub>1</sub>-Pflanzen, die sowohl Rekombinase- als auch Erkennungssequenzen beinhalteten, zeigten ausnahmslos sequenz-spezifische Deletionen. Das Fehlen von nicht-rekombinierten Transgenen in diesen Pflanzen könnte nahe legen, dass die aus der Cre-vermittelten Rekombination hervorgehende zirkuläre, loxP-haltige DNA (*lox.pat.nos*) verloren geht und der Rekombinase zur reversiblen Reaktion (Integration) nicht mehr zur Verfügung steht.

Entgegen der bisherigen Annahme, dass aus Exzision resultierende, extrachromosomale DNA degradiert oder sich während Zellteilungen verdünnt, wiesen Srivastava und Ow (2003) nach, dass herausrekombinierte, zirkuläre DNA in einigen Fällen nicht abgebaut wurde. Sie konnten in Weizen ringförmige extrachromosomale DNA nachweisen, die aus der Exzision von lox-flankierter DNA hervorging.

Während dieser Arbeit wurden Nachkommen, die erfolgreiche Rekombinationen aufwiesen, nicht auf persistierende, zirkuläre DNA untersucht. Durch Southern Blot-Analysen könnte DNA mit einer Größe der herausrekombinierten DNA (*lox.pat.nos*, 900 bp) detektiert werden.

Auch in Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generation konnte die Cre-vermittelte rekombinierte Transgen-DNA nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Kapitel 6.2). Die in Southern Blot-Analysen im Vergleich zur nicht-rekombinierten Transgenkassette *Ubi.2lox.pat* verkürzte, 1,5 kbp lange *Ubi.lox*-Kassette war in F<sub>2</sub>-Nachkommen nicht häufiger zu finden, als theoretisch zu erwarten. Daher scheint kein weiterer Rekombinationsschritt mehr stattgefunden zu haben, wie es der Fall wäre, wenn noch extrachromosomale, zirkuläre lox-DNA in der Pflanzen verbleiben würde.

Die Vererbung des rekombinierten Locus wird auch dadurch unterstützt, dass einige F<sub>2</sub>-Pflanzen nur noch den rekombinierten Locus in Abwesenheit des *cre*-Rekombinasegen

trugen und neuerliche Exzisionen durch das Fehlen der Rekombinase ausgeschlossen waren.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob sich innerhalb unvollständig integrierter Transgenkopien noch *loxP-sites* befinden. Die für die Kreuzung mit Rekombinase-Pflanzen genutzten  $T_0$ -Pflanzen mit der *Ubi.2lox.pat*-Kassette wiesen in Southern Blot-Analysen zur Überprüfung der vollständigen Transgenintegration neben der die vollständige Kassette repräsentierenden 2,45 kbp-Bande eine weitere, 3,6 kbp große Bande auf. Da sich diese nach Kombinierung mit der Cre-Rekombinase in  $F_1$ -Pflanzen nicht verkürzte, ist davon auszugehen, dass dieses Fragment keine zwei intakten *loxP-sites* enthielt.

Ob dieses Fragment nur eine einzelne intakte *loxP*-Sequenz oder entgegengesetzt orientierte *sites* trägt, ist schwer zu beantworten.

Vergunst *et al.* (2000) berichteten von unerwarteten Rekombinationsreaktionen durch die zufällige Integration von *loxP*-DNA. Es kam zu Exzisionen und Inversionen zwischen unabhängigen Erkennungssequenzen.

Wäre eine vermeintliche *loxP-site* im 3,6 kbp-Fragment in dieselbe Richtung orientiert, wie die nach Eliminierung der *lox.pat.nos*-Sequenz aus der vollständigen Transgenkassette im Genom verbliebene, würde es zur Exzision der zwischen den beiden *loxP-sites* befindlichen DNA kommen. Dies wurde in Pflanzen der  $F_2$ -Generation nicht beobachtet.

Auch bei einer Inversion aufgrund von entgegengesetzt orientierten *loxP*-Sequenzen würde sich das Bandenmuster in Southern Blot-Analysen verändern. Da jedoch keine unerwartete Veränderung des Bandenmusters beobachtet werden konnte, scheint demnach keine intakte *loxP-site* im 3,6 kbp-Fragment zu existieren.

Verglichen mit anderen Methoden zu Eliminierung von Markergenen, beispielsweise der Transposition, zeigt nicht nur diese Arbeit beachtliche Vorteile der sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme auf. Zum einen ist die Exaktheit, mit der sequenz-spezifische Exzisionen vorkommen und die auch in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ein großer Vorteil der Rekombinationssysteme gegenüber der Transposition. Gerade die Anwendung von transposablen Elementen in heterologen Systemen führte in einigen Fällen zur ungenauen Exzision. So wiesen Scholz *et al.* (2001) in transgener Gerste Veränderungen der DNA nach Exzision des aus Mais stammenden *Activator (Ac)*-Elements nach.

Ein weiterer Vorteil der sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme gegenüber der Transposition als Mittel zur Exzision von Markergenen besteht in der hohen Frequenz der Rekombinationsreaktionen (zur Übersicht: Ebinuma *et al.*, 2001). Belzile *et al.* (1989) schätzten, dass in transgenen Tomatenpflanzen weniger als 10 % der *Ac*-Transposons nach Exzision verloren gingen. Die Exzisionsfrequenz in Mais beziffern Levy und Walbot (1990) sogar auf nur 0,1-5,6 %. Dieser Verlust der mobilen Elemente kann zur Eliminierung von

Markergenen ausgenutzt werden, indem das Selektionsmarkergen innerhalb des Transposons eingebaut würde. Re-integriert das Transposon in einen unabhängigen Locus, kann das Markergen in der nächsten Generation segregieren und auf diese Weise aus dem Pflanzengenom eliminiert werden. Dies passiert in etwa der Hälfte der Transpositionen (zur Übersicht: Yoder und Goldsbrough, 1994).

Einen eleganten Weg zur sofortigen Eliminierung von Markergensequenzen aus transgenen Pflanzenzellen beschrieben Ebinuma *et al.* (1997). Der Einbau des Selektionsmarkergens *ipt* für die Isopentenyl Transferase in das *Ac*-Element ermöglichte die Exzision des Markers durch Transposition in Tabak- und *Populus*-Hybrid-Zellen. Die Isopentenyl Transferase katalysiert die Reaktion zu einer Cytokinin-Vorstufe. Diese Hormone fördern zwar die Proliferation von transgenen Zellen auf hormonfreiem Medium, *ipt*-Pflanzen zeigen jedoch in Abwesenheit anderer Hormone, wie Auxin, kein Sprosswachstum, so dass eine einfache visuelle Selektion erfolgen kann. Der sehr geringe Anteil an regenerierten, markerfreien Pflanzen von 0,032 % war durch die Selektionsmethode jedoch leicht zu identifizieren.

Zusammengefasst scheint die präzise und effiziente Exzision durch sequenz-spezifische Rekombinationssysteme in diversen Pflanzenarten ein geeignetes Mittel zur Eliminierung unerwünschter Markergene zu sein.

## 2 Hinweise auf gerichtete Integrationsereignisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *in vitro*-Tests neben Exzisions- auch sequenz-spezifische Integrationsereignisse nachgewiesen werden. Durch Cre-vermittelte Rekombination konnte ein promotorloses *gus*-Gen mit einer loxP-Sequenz an einer einzelnen loxP-*site* stromabwärts des Promotors integrieren. Diese Reaktion konnte durch einen PCR-Ansatz dargestellt werden (siehe Ergebnisse Kapitel 2, Abb. 11).

Sequenz-spezifische Integrationen eines promotorlosen *gus*-Konstruktes mit Erkennungssequenz zeigten sich ebenfalls nach der Transformation von monokotylem Gewebe mit loxP- bzw. FRT-haltigen Konstrukten zusammen mit der korrespondierenden Rekombinase (siehe Ergebnisse Kapitel 3.1 und 3.2).

Die Untersuchung von Nachkommen aus Kreuzungen stabil transformierter Maispflanzen gab Hinweise auf erfolgreiche Integrationen. Verwendet wurden unreife Embryonen, von F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Pflanzen, in denen durch sequenz-spezifische Rekombination die zwischen den loxP-*sites* befindliche DNA eliminiert wurde und die neben der verbleibenden loxP-Sequenz auch das *cre*-Gen trugen. In transienten Transformationen unreifer Skutella rekombinanter Maislinien mit einem promotorlosen *gus*-Gen mit einer loxP-Sequenz tragenden *gus*-

Konstrukt (plox.gus) konnten deutlich mehr transiente Signale beobachtet werden, als bei den Kontrollen, bei denen nicht-transgene Skutella beschossen wurden (siehe Ergebnisse Kapitel 6.1 und 6.6). Die wenigen Signale, die auch hierbei auftraten, könnten möglicherweise durch eine zufällige Integration des promotorlosen gus-Gens stromabwärts eines endogenen Maispromotors verursacht worden sein.

Gelänge es, aus dem gus-positiven Gewebe Pflanzen zu regenerieren, ist zu vermuten, dass an der Erkennungssequenz im Pflanzengenom das promotorlose lox.gus-Konstrukt integriert vorläge. Sinnvoll dafür wäre der Gebrauch von homozygoten Linien, deren Erzeugung jedoch in dieser Arbeit nicht möglich war.

Dass monokotyle Embryonen mit einer einzelnen Erkennungssequenz geeignet sind, um durch Transformation ein Wunschgen mit ebenfalls einer Erkennungssequenz sequenz-spezifisch zu integrieren, zeigten Srivastava *et al.* (2004). Transgene Reiskalli, die eine einzelne lox-site und das cre-Rekombinasegen trugen, wurden biolistisch mit einem Konstrukt zur lox-spezifischen Integration re-transformiert. Es konnten in Kallusgewebe und den daraus regenerierten Pflanzen Integrationsereignisse nachgewiesen werden.

Eine Besonderheit ihres Ansatzes war die Verwendung von verschiedenen lox-sites, die das Integrationsereignis stabilisieren. Nach sequenz-spezifischer Integration werden üblicherweise wieder Erkennungs-sites generiert; das entstandene Produkt ist ein von zwei gleichgerichteten Erkennungssequenzen umgebenes Zielgen und sogleich Substrat für eine Exzisionreaktion durch dieselbe Rekombinase. Da die intramolekulare Exzision im Gleichgewicht der Rekombinationsreaktionen gegenüber der Rekombination zwischen nicht verbundenen sites (Integration) kinetisch begünstigt wird, kommt es zur Exzision des eingeführten Transgen.

Schon 1986 führten Hoess und Mitarbeiter Untersuchungen in Tabakprotoplasten mit verschiedenen lox-Sequenzen durch und stellten fest, dass nur gleiche lox-sites zu einer effizienten Rekombination führten. Albert *et al.* (1995) untersuchten verschiedene Erkennungssequenzen und mutierten den Bereich des *inverted repeats*. Sie beobachteten, dass derart mutierte lox-sites bei der Rekombination mit der Wildtyp-loxP-site in Abhängigkeit von der Cre-Konzentration Exzision oder Integration bevorzugen. Srivastava und Mitarbeiter (Srivastava und Ow, 2001; Srivastava *et al.*, 2004) nutzten diese Erfahrung und verwendeten die mutierte lox76-site, die ein Wildtyp - *Inverted Repeat* (IR) und ein mutiertes IR besaß, als einzelne Zielsequenz im Reisgenom. Das Konstrukt zur Integration enthielt die lox75-site, die genau andersherum mutiert war. Rekombination zwischen diesen lox-sites führte zu zwei verschiedenen lox-sites, zum einen entstand eine Wildtyp-loxP-site, zum anderen die gemischte lox75/76-site, in der nun beide *inverted repeats* mutiert waren.

Eine Rekombination zwischen diesen beiden Erkennungssequenzen wurde nicht mehr preferiert, die Integration stabil.

Neben der Bevorzugung der Integration durch die Wahl geeigneter Erkennungssequenzen, ist auch die transiente Anwesenheit der Rekombinase eine Möglichkeit zur Vermeidung von ungewollten Rück-, d. h. Exzisionsreaktionen (siehe Diskussion Kapitel 3).

Eine sofortige Eliminierung von integrierten lox-Sequenzen könnte auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten transienten Versuche relativieren. Nach Transformation von transgenen Maisembryonen, deren Elter sowohl das *cre*-Rekombinasegen als auch eine einzelne loxP-*site* trug, mit dem Integrationskonstrukt plox.*gus* wäre die Rate der sequenz-spezifischen Integration vermutlich höher, wenn die Rekombinase nur vorübergehend exprimiert worden wäre. Dadurch ließe sich die Exzision der lox.*gus*.lox-Sequenz minimieren. Vergunst *et al.* (1998) wiesen in 89 % der nach Integration einer lox-*nptII*-Sequenz hervorgehenden Kalli präzise Integrationen nach. Die restlichen Ereignisse ließen sich vermutlich auf Neuarrangements, wie z. B. Deletionen, zurückführen.

Mit einer transienten Anwesenheit der Rekombinase kann häufig beschriebenen, unpräzisen Integrationen begegnet werden. So beobachteten Srivastava *et al.* (2004) oft unpräzise Integrationen in Reis. Sie führten diese einerseits auf zufällige Integrationen in die Nähe von pflanzlichen Promotoren, andererseits auf unerwartete Neuarrangements zwischen mehrfach integrierten Sequenzen während der biolistischen Transformation zurück. Wäre die Rekombinase nicht konstitutiv vorhanden, könnten ansonsten fortwährende Rekombinationsreaktionen beendet werden.

Die Minimierung zufälliger Integrationen scheint die gegenwärtige Herausforderung bei der sequenz-spezifischen Integration darzustellen, denn das Ziel der gerichteten Integration ist der singuläre Einbau des Transgens in eine bekannte genetische Umgebung. Aber auch hinsichtlich der Vorhersehbarkeit der Expressionsstärke zeigten sich bei der Anwendung des Cre/loxP-Systems in pflanzlichen Zellen unerwartete Veränderungen. Day *et al.* (2000) konnten in 50 % der sequenz-spezifischen Integrationen eine reduzierte Expressionsstärke des eingeführten Transgens feststellen.

### 3 Transiente Anwesenheit der Rekombinase

Durch eine vorübergehende Anwesenheit der Rekombinase könnten ungewollte Rekombinationsreaktionen vermieden werden. Dafür stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Die Anwesenheit der Rekombinase in der Zelle kann beispielsweise durch eine transiente Expression der Rekombinasegene eingeschränkt werden; auch induzierbare Systeme können die Expression der Rekombinase regulieren.

Transiente Expressionen sind auf verschiedene Weise zu verwirklichen. Durch eine Eliminierung des Rekombinasegens wäre die Expression der Rekombinase zeitlich beschränkt. In diesem Sinne konnten Mlynarova und Nap (2003) in Tabak einen Autoexzisionsansatz umsetzen. Das von *loxP-sites* umgebene, aufgrund eines Intron in der Sequenz nur in Pflanzen exprimierbare *cre*-Gen, wurde erfolgreich durch die selbstvermittelte Rekombination eliminiert. Dadurch wurde die Expression eines stromabwärts des nach der Rekombination verbleibenden Promotors gelegenen Hygromycin-Resistenzgens ermöglicht und *cre*-Eliminierung somit nachgewiesen.

Einer ähnlichen Strategie folgten Albert *et al.* (1995) in Tabak und Vergunst *et al.* (1998; 2000a) in *Arabidopsis thaliana*. Durch die Trennung von Rekombinasegen und Promotor wurde die Expression unterbunden. Dies erreichten die beiden Arbeitsgruppen durch die Platzierung der einzelnen genomischen *lox-site* zwischen Promotor und *cre*-Rekombinasegen. Nach sequenz-spezifischer Integration des Zielgens an dieser Erkennungssequenz stromabwärts des Promotors wird die Expression der *cre*-Rekombinase unterbrochen und damit die Integration stabilisiert.

Transiente *cre*-Expression erreichten Gleave *et al.* (1999) auch durch die Ko-Kultivierung von Agrobakterien, die eine *cre*-tragende T-DNA beinhalten, mit transgenen, *loxP*-tragenden Tabak-Blattscheiben. Sie nutzten aus, dass kurz nach der Infektion mit Agrobakterien Gene auch von nicht-integrierten T-DNA-Molekülen exprimiert werden können.

Vielversprechend ist auch ein Ansatz der Arbeitsgruppe um Vergunst, nur das Cre-Protein in die Pflanze einzuführen (Vergunst *et al.*, 2000b). Bei der Transformation durch Agrobakterien vermitteln die Proteine VirB und VirD4 den Transport des Komplexes aus T-DNA und den Einzelstrang-bindenden Proteinen VirE2 und VirF in die Pflanzenzelle. Vergunst und Mitarbeiter (2000b) fusionierten das *cre*-Rekombinasegen mit den Genen *virE2* oder *virF* zur Expression in Agrobakterien. Das Fusionsprotein konnte durch VirB/D4-abhängige Proteintranslokation in *Arabidopsis thaliana* sequenz-spezifische Rekombinationen an zuvor in die Pflanze eingeführten *loxP*-Sequenzen auslösen.

Um die Expression der Rekombinase zu induzieren, gibt es gleichfalls verschiedene Möglichkeiten. Die Expression sowohl der *cre*- als auch der *flp*-Rekombinase durch einen

hitzeinduzierten Promotor konnte in *Arabidopsis thaliana* (*cre*: Hoff *et al.*, 2001; *flp*: Kilby *et al.*, 2000), in Tabak (*flp*: Kilby *et al.*, 1995) und in Mais (*cre*: Zhang *et al.*, 2003) gezeigt werden. Zhang und Mitarbeiter (2003) flankierten neben den Marker auch den durch Hitzeschock induzierbaren Promotor und das *cre*-Rekombinasegen mit Erkennungssequenzen, so dass nach Induktion nicht nur der Marker, sondern auch die Rekombinase entfernt werden konnte.

Zuo *et al.* (2001) wählten eine durch Östrogen induzierte Expression der *cre*-Rekombinase in *Arabidopsis thaliana*. Joubes *et al.* (2004) konnten in Tabakzellen ein mit Dexamethason regulierbares System durch die Fusion des Glukokortikoidrezeptor und der *cre*-Rekombinase entwickeln.

Sehr interessant ist Kopertekhs *et al.* (2004) virale Expression der *cre*. Hierbei werden lox-haltige Tabakpflanzen mit einem Kartoffelvirus infiziert, welcher das *cre*-Gen trägt und somit die Exzision der zwischen den Erkennungssequenzen befindlichen DNA im Tabakgenom vermittelt. Nachkommen der Pflanzen beinhalten weder Cre-Rekombinase noch Virusproteine.

Ein in jüngerer Vergangenheit genutztes Rekombinationssystem, das  $\phi$ C31-System aus dem gleichnamigen *Streptomyces*-Phagen, bietet die Möglichkeit zur gezielten Integration (zur Übersicht: Thorpe und Smith, 1998). Rekombination zwischen der aus dem Phagen stammenden *attP-site* und der bakteriellen *attB-site* führt zur sequenz-spezifischen Integration der Phagen-DNA. Nötig dafür ist eine Phagen-kodierte, 68 kDa große Integrase und ein bakterieller *Integration Host*-Faktor. Diese Reaktion ist ohne zusätzliches Phagen-Protein, einer Excisionase, irreversibel. In heterologen Systemen eingesetzt, könnten so problematische Rückreaktionen verhindert und somit der integrative Zustand stabilisiert werden. Das  $\phi$ C31-System konnte erfolgreich in Hefe (Thomason *et al.*, 2001), tierischen Zellen (Belteki *et al.*, 2003; Groth *et al.*, 2004) und Tabakpflanzen (Ow *et al.*, 2001) verwendet werden.

#### **4 Vergleichende Betrachtungen der beiden verwendeten Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT**

In dieser Arbeit stellte sich besonders das Rekombinationssystem Cre/loxP als geeignet für sequenz-spezifische Rekombinationen in Mais heraus. Der Vergleich zwischen den beiden verwendeten Systemen Flp/FRT und Cre/loxP in transienten Transformationsversuchen kann sicher keine hinreichenden Hinweise auf eine höhere Effizienz des Rekombinationssystems Cre/loxP geben (siehe Ergebnisse Kapitel 3). In während dieser Arbeit

vorgenommenen Kreuzungen von stabil transformierten Maispflanzen wurden jedoch hoch-effiziente, sequenz-spezifische Deletionen mithilfe des Cre/loxP-Systems beobachtet. Dergleichen konnte mit dem Flp/FRT-System nur bedingt nachgewiesen werden. In Southern Blot-Analysen konnten keine Flp-vermittelten Rekombinationsereignisse detektiert werden (siehe Ergebnisse Kapitel 5.2); nur durch Amplifikation der Sequenz der Rekombinationsorte durch PCR wurde rekombinierte DNA nachgewiesen (siehe Ergebnisse Kapitel 5.3). Die Effizienz scheint in dem benutzten Flp/FRT-System daher niedriger zu sein.

Obwohl sich aktuelle Veröffentlichungen von Anwendungen sequenz-spezifischer Rekombinationssysteme in Pflanzen häufiger mit dem Cre/loxP-System beschäftigen und dort erfolgreich zur Eliminierung von lox-flankierten Sequenzen (zur Übersicht: Gilbertson, 2003) bzw. zur Integrationen von lox-Sequenzen eingesetzt wurden (Srivastava *et al.*, 2004), sind auch sequenz-spezifische Rekombinationen mithilfe des Flp/FRT-Systems in Pflanzen beschrieben worden (zur Übersicht: Lyznik *et al.*, 2003).

Dass das Flp/FRT-System aufgrund seines eukaryotischen Ursprungs in Pflanzen besser funktionieren könnte als das Cre/loxP-System aus dem P1-Bakteriophagen, spiegelt nicht die Ergebnisse der zitierten Veröffentlichungen wider und konnte auch während dieser Arbeit nicht belegt werden.

Es stellt sich die Frage, warum gerade das Cre/loxP-System sehr gut in Mais funktioniert. Ein Grund könnte in einer höheren Affinität der Cre-Rekombinase zur loxP-Sequenz gegenüber der Flp-Rekombinase zur FRT-*site* liegen. Dies konnten Ringrose und Mitarbeiter (1998) nachweisen. Der Cre-loxP-Komplex scheint sehr viel stabiler zu sein, als der der Flp-Rekombinase.

Es wurde aber in derselben Arbeit gezeigt, dass die Cre-vermittelte Exzisionsrate nur bis zu 75 % beträgt, während die Flp-Rekombinase Exzisionen in bis zu 100 % katalysiert. Die in dieser Arbeit beobachtete 100%ige Exzision des loxP-flankierten Markergens weicht davon ab, wurde aber, wie bereits beschrieben, auch in anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen (zur Übersicht: Ebinuma *et al.*, 2001).

Ein weiterer Grund für die sehr erfolgreiche Cre-vermittelte Exzision in Mais könnte in der unterschiedlichen Thermostabilität der beiden Rekombinasen liegen (Buchholz *et al.*, 1996). Sie ermittelten unterschiedliche Temperaturoptima für die beiden Enzyme. So lag die optimale Reaktionstemperatur der Flp-Rekombinase bei 30°C, während ab Temperaturen von 39°C aufwärts keine Aktivität mehr detektiert werden konnte. Dagegen zeigte die Cre-Rekombinase bei deutlich höheren Temperaturen, ab 37°C, effiziente Exzisionen.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Kreuzungen zwischen *cre*-Rekombinase-Pflanzen und Pflanzen mit einem loxP-flankierten Markergen wurden im Hochsommer vorgenommen.

Gerade die im Sommer 2003 herrschenden, sehr hohen Temperaturen könnten sich positiv auf die Enzymaktivität der Cre-Rekombinase ausgewirkt haben, so dass sehr effektive Rekombinationsreaktionen nachgewiesen werden konnten.

Kreuzungen zwischen *flp*-Rekombinase- und FRT-Pflanzen wurden im Spätsommer durchgeführt; Höchsttemperaturen von circa 28°C (Wetterstatistik für Hamburg von <http://www.wetteronline.de>) sollten die Aktivität der Rekombinase theoretisch nicht mindern. Natürlich ist eine zeitweilige Temperaturerhöhung, verbunden mit einer möglichen abnehmenden Enzymaktivität, denkbar. Ob sich diese durch eine Reduktion der Proteinmenge erklären ließe, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

In einer weitergehenden Analyse wiesen Buchholz und Mitarbeiter (1998) jedoch auch nach, dass *in vitro*, in *E.coli* und in Säugerzellen die thermostabilere Cre-Rekombinase bei ihrem Temperaturoptimum eine deutlich geringere Exzisionseffizienz zeigte, als die Flp-Rekombinase bei ihrer optimalen Temperatur.

Die Anwendung des Cre/loxP-Systems in pflanzlichen Zellen führte sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Arbeitsgruppen zu effizienten Rekombinationsreaktionen.

## 5 Ausblick

Die durchgeführten Arbeiten ermöglichten die sequenz-spezifische und effiziente Eliminierung des von Erkennungssequenzen flankierten Markergens und bieten damit Ansatzpunkte zur Erzeugung von markerfreiem Getreide.

Um Pflanzen nicht nur ohne Markergene, sondern auch ohne zusätzliche Vektorsequenzen produzieren zu können, sollte bei der Transformation von Nutzpflanzen durch die Verwendung von Minimalkassetten auf Rückgratsequenzen des Vektors verzichtet werden. Diese Minimalkassetten wären von Erkennungssequenzen umgeben, so dass sie nach erfolgreicher Rekombination exzidiert werden und lediglich eine kurze Erkennungssequenz im pflanzlichen Genom verbleibt.

Für die Kreuzung mit Rekombinase-Pflanzen sollten Pflanzen verwendet werden, die nur eine von Erkennungssequenzen flankierte Transgenkopie enthalten. Ein einfaches Bandenmuster erleichtert die Identifizierung von Rekombinationsereignissen und minimiert das Risiko von unerwarteten Rekombinationen zwischen mehreren genomischen *lox-sites*.

Der Einsatz von Selektionsmarkergenen, die sowohl positive als auch negative Selektion erlauben, könnten zudem die Erkennung der gewünschten Pflanzen erleichtern. Ersttransformatanten, in denen das Markergen zur Selektion nötig ist, und Nachkommen, in denen nach Rekombination kein Markergen mehr enthalten sein sollte, könnten durch dasselbe Markersystem identifiziert werden. Mit dem Selektionsgen *dao1* für die D-

Aminosäure Oxidase können transgene Zellen entweder die für Pflanzen toxischen Aminosäuren D-Alanin und D-Serin in nicht-toxische Metabolite umsetzen oder nur gering toxisches D-Isoleucin oder D-Valin in toxische Ketosäuren (Erikson *et al.*, 2004).

Diese Arbeit lieferte erstmals für Mais Hinweise auf sequenz-spezifische Integrationsereignisse durch biolistische Transformation von Embryonen, dessen Eltern sowohl Rekombinase als auch eine einzelne genomische Erkennungssequenzen trugen, mit einer *lox.gus*-Sequenz. Da die hier eingesetzten Eltern heterozygot waren, sind Versuche zur Integration eines *lox.gus*-Konstruktes in die genomische Erkennungssequenz transgener Embryonen, nur schwer zu bewerten. Homozygote Elternpflanzen würden eine stabile Vererbung und die Quantifizierbarkeit der Integrationsversuche gewährleisten.

Optimierungen der Transformation von integrativen Embryonen und der nachfolgenden *in vitro*-Kultivierung stehen aus, um aus den Embryonen Pflanzen mit spezifischen Integrationen zu regenerieren.

Eine Unsicherheit bei der sequenz-spezifischen Integration besteht in der bereits beschriebenen, sofortigen Eliminierung des entstandenen Integrationsproduktes durch die Rekombinase. Die Verwendung von mutierten *lox-sites* kann die Integration stabilisieren.

Auch die transiente Anwesenheit der Rekombinase dient der Stabilisierung der Integration. Bisher wurde die Rekombinase konstitutiv exprimiert, so dass die zunächst vermittelte Integration sofort wieder aufgelöst werden kann. Sinnvoll ist beispielsweise eine induzierbare Rekombinase, die nur in nach Zugabe eines Induktors exprimiert wird. Eine Möglichkeit zur Induzierbarkeit bietet die Fusion mit der Rezeptordomäne des Glukokortikoidrezeptors (GR) aus Ratte. Das Fusionsprotein aus Rekombinase und GR wird nur dann in den Kern transportiert und vermittelt sequenz-spezifische Rekombination, wenn der Induktor Dexamethason vorliegt (Joubes *et al.*, 2004). Auch hitzeinduzierte Systeme sowie die unter Kapitel 3 diskutierten Möglichkeiten zur vorübergehenden Anwesenheit der Rekombinase wären denkbar.

Derzeit nicht vorliegende Untersuchungen zur Halbwertszeit der Rekombinasen würden ebenfalls Aussagen über die Dauer der Proteinaktivität ermöglichen.

**F Literaturverzeichnis**

- Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. *Plant J* 7: 649-459.
- Araki H, Jearnpiparkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Ushio K, Muta T, Oshima Y (1985). Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *J Mol Biol* 182: 191-203.
- Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* 5: 433-440.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-736.
- Bayley CC, Morgan M, Dale EC, Ow DW (1992). Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-*lox* site-specific recombination system. *Plant Mol Biol* 18: 353-361.
- Becker D, Brettschneider R, Lörz H (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J* 5: 299-307.
- Belteki G, Gertsenstein M, Ow DW, Nagy A (2003). Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing  $\phi$ C31 integrase. *Nature Biotechnol* 21: 321-324.
- Belzile F, Lassener MW, Tong Y, Khush R, Yoder JI (1989). Sexual Transmission of transposed *Activator* Elements in Transgenic Tomatoes. *Genetics* 123: 181-189.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983). A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
- Brandt P (1999). Antibiotika-Resistenzgene als Marker in gentechnisch veränderten Pflanzen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 42: 51-57.
- Brandt P (2001). Die neue Generation von Marker-Genen zum frühen Erkennen von gentechnisch veränderten Pflanzen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 12: 1188-1193.
- Breitler JC, Labeyrie A, Meynard D, Legarve T, Guiderdoni E (2002). Efficient microprojectile bombardement-mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theor Appl Genet* 104: 709-719.
- Brettschneider R, Becker D, Lörz H (1997). Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet* 94: 737-748.
- Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M (1982). Recombination within the yeast plasmid 2  $\mu$  circle is site-specific. *Cell* 29: 227-234.
- Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucl Acids Res* 24: 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.
- Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Kloti A, Armstrong GA, Schledz M, Lintig J von, Potrykus I (1997). Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* 11: 1071-1078.
- Chen JM, Carlson AR, Wan JM, Kasga KJ (2003). Chromosomal location and expression of green fluorescent protein (gfp) gene in microspore derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *Yi Chuan Xue Bao* 30: 697-705.
- Chen JW, Evans B, Rosenfeldt H, Jayaram M (1992). Bending-incompetent variants of Flp recombinase mediate strand transfer in half-site recombinations: role of DNA bending in recombination. *Gene* 119: 37-48.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18: 675-689.
- Church GM, Gilbert W (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM (1985). Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
- Corneille S, Lutz K, Svab Z, Maliga P (2001). Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *Plant J* 27: 171-178.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992). Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- Dale EC, Ow DW (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91: 19-85.
- Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC (1998). Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep Publ* 17: 489-496.
- Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW (2000). Transgenes integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Develop* 14: 2869-2880.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6: 2513-2518.

- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1997). T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J* 11: 15-29.
- Dhaese P, De Greve H, Gielen J, Guernich J, Van Montagu M, Schell J (1983). Identification of sequences involved in polyadenylation of higher plants nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *EMBO J* 2: 419-429.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997). Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2117-2121.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K, Komamine A (2001). Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20: 383-392.
- Eckes P, Vijtewaal B, Donn, G (1989). Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-Phosphinothricin in plants. *J. Cell Biochem Suppl* 13D: 334.
- Ellaiah P, Prakash GJ, Prabhakar T, Saisha V (2003). Site specific integration of FLP recombinase in BHK-21 cell line. *Indian J Exp Biol* 41: 570-573.
- Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA). Internetseite: <http://www.efsa.eu.int>.
- Evans BR, Chen JW, Parsons RL, Bauer TK, Teplow DB, Jayaram M (1990). Identification of the Active Site Tyrosine of Flp Recombinase. *J Biol Chem* 265: 18504-18510.
- Folck AC (2004). Posttranskriptionale Geninaktivierung der  $\alpha$ -Gliadine in Weizen *Triticum aestivum* L. Dissertation, Universität Hamburg.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 80: 4803-4807.
- Fukushige S, Sauer B (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7905-7909.
- Futcher AB (1986). Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* 119: 197-204.
- Gidoni D, Bar M, Gilboa N (2001). FLP/FRT-mediated restoration of normal phenotypes and clonal sectors formation in *ro/C* transgenic tobacco. *Transgenic Res* 10: 317-328.
- Gilbertson L (2003). Cre-lox recombination: Cre-active tools for plant biotechnology. *Trends Biotechnol* 21: 550-555.
- Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, Morris BA (1999). Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of *cre* recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol* 40: 223-235.

- Goldsbrough AP, Lastrella CN, Yoder JI (1993). Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technol* 11: 1286-1292.
- Golic KG, Lindquist S (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
- Golic MM, Rong YS, Peterson RB, Lindquist SL, Golic KG (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Res* 25: 3665-3671.
- Gong WJ, Golic KG (2003). Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2556-2561.
- Gopaul DN, Guo (1998). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J* 17: 4175-4187.
- Green CE, Phillips RL (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci* 15: 417-421.
- Gronostajski RM, Sadowski PD (1985a). Determination of DNA Sequences essential for FLP-mediated Recombination by a Novel Method. *J Biol Chem* 260: 12320-12327.
- Gronostajski RM, Sadowski PD (1985b). The FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 microns plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. *Mol Cell Biol* 5: 3274-3279.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004). Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase From Phage  $\phi$ C31. *Genetics* 166: 1775-1782.
- Grundy FJ, Howe MM (1984). Involvement of the invertible G segment in bacteriophage mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134: 296-317.
- Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389: 40-46.
- Guo F, Gopaul DN, Van Duyne, GD (1999). Asymmetric DNA Bending in the Cre-loxP Site specific Recombination Synapse. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 7143-7148.
- Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998). The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Molec Biol* 37: 287-296.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *E.coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hare PD, Chua NH (2002). Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnol* 20: 575-580.
- Hartley JL, Donelson JE (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* 286: 860-865.

- Haughn GW, Smith J, Mazur B, Somerville C (1988). Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Mol Gen Genet* 211: 266-271.
- He Z, Fu Y, Si H, Hu G, Zhang S, Yu Y, Sun Z (2004). Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Science* 166: 17-22.
- Herrera-Estrella L, Depicker LA, Van Montagu M, Schell J (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209-213.
- Hoa TT, Bong BB, Huq E, Hodges TK (2002). Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor Appl Genet* 104: 518-525.
- Hoff T, Schnorr KM, Mundy J (2001). A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 45: 41-49.
- Hohe A, Reski R (2003). A tool for understanding homologous recombination in plants. *Plant Cell Rep* 21: 1135-1142.
- Hohn B, Levy AA, Puchta H (2001). Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 12:139-143.
- Hollingshead S, Vapnek D (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid* 13: 17-30.
- Huang LC, Wood EA, Cox MM (1991). A bacterial model system for chromosomal targeting. *Nucleic Acids Res* 19: 443-448.
- Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich WH, Neumann KH (2002). The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 71: 157-164.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jefferson RA (1986).  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8447-8451.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Guldager Petersen S, Brunstedt J, Okkels, FT (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molec Breed* 4: 111-117.
- Joubes J, De Schutter K, Verkest A, Inze D, De Veylder L (2004). Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J* 37: 889-896.

- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molec Biol* 43: 179-188.
- Kahmann R, Basse C (1999). REMI (Restricted Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Europ J Plant Pathol* 105: 221-229.
- Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9: 413-421.
- Kilby NJ, Gareth J Davies, Michael R Snaith, James A.H Murray (1995). FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J* 8: 637-652.
- Kilby NJ, Fyvie MJ, Sessions RA, Davies GJ, Murray JA (2000). Controlled induction of GUS marked clonal sectors in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 51: 853-863.
- Knutzon DS, Hayes TR, Wyrick A, Xiong H, Davies HM, Voelker TA (1999). Lysophosphatidic Acid Acyltransferase from Coconut Endosperm Mediates the Insertion of Laurate at the *sn*-2 Position of Triacylglycerols in Lauric Rapeseed Oil and Can Increase Total Laurate Levels. *Plant Physiol* 120: 739-746.
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 10: 165-174.
- Konsolaki M, Sanicola M, Kozlova T, Liu V, Arca B, Savakis C, Gelbart WM, Kafatos FC (1992). FLP-mediated intermolecular recombination in the cytoplasm of *Drosophila* embryos. *New Biol* 4: 551-557.
- Kopertekh L, Jüttner G, Schiemann J (2004). Site-specific recombination induced in transgenic plants by PVX virus vector expressing bacteriophage P1 recombinase. *Plant Sci* 166: 485-492.
- Koshinsky HA, Lee E, Ow DW (2000). Cre-*lox* site-specific recombination between *Arabidopsis* and tobacco chromosomes. *Plant J* 23: 715-722.
- Kovalchuk I, Kovalchuk O, Kalck V, Boyko V, Filkowski J, Heinlein M, Hohn B (2003). Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature* 423: 760-762.
- Kuckuck H, Kobabe G, Wenzel G (1985). *Grundzüge der Pflanzen-Züchtung*. Walter de Gruyter Verlag.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee G, Saito I (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216: 55-65.

- Lei L, Songmei L, Yuanlei H, Zhongping L (2000). Co-transformation to tobacco of Cre//lox site-specific recombination system and its precise recombination. *Chin Sci Bull* 45: 540-543.
- Levy AA, Walbot V (1990). Regulation of the Timing of Transposable Element Excision During Maize Development. *Science* 248: 1534-249.
- Lloyd AM, Davis RW (1994). Functional expression of the yeast FLP/FRT site specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 242: 653-657.
- Luetke KH, Sadowski PD (1998). Determinants of the position of a Flp-induced DNA bend. *Nucleic Acids Res* 26: 1401-1407.
- Luo H, Lyznik LA, Gidoni D, Hodges TK (2000). FLP-mediated recombination for use in hybrid plant production. *Plant J* 23: 423-430.
- Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L, Hodges TK (1993). Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res* 21: 969-975.
- Lyznik LA, Hirayama L, Rao KV, Abad A, Hodges TK (1995). Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *Plant J* 8: 177-186.
- Lyznik LA, Rao KV, Hodges TK (1996). FLP-mediated recombination of *FRT* sites in the maize genome. *Nucleic Acids Res* 24: 3784-3789.
- Lyznik LA, Gordon-Kamm WJ, Tao Y (2003). Site-specific recombination for genetic engineering in plants. *Plant Cell Rep* 21: 925-932.
- Mack A, Sauer B, Abremski K, Hoess R (1992). Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res* 20: 4451-4455.
- Maeser S, Kahmann R (1991). The Gin recombinase of phage Mu can catalyze site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol Gen Genet* 230: 170-176.
- Matsunaga E, Sugita K, Ebinuma H (2002). Asexual production of selectable marker-free transgenic woody plants vegetatively propagated species. *Molec Breed* 10: 95-106.
- Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, Araki H, Oshima Y (1990). Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J Bacteriol* 172: 610-618.
- Matzke MA, Matzke AJ (1998). Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence response. *Cell Mol Life Sci* 54: 94-103.
- Matzke MA, Aufsatz W, Kanno T, Mette MF, Matzke AJ (2002). Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. *Adv Genet* 46: 235-275.
- Mazur B, Krebbers E, Tingey S (1999). Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285: 372-375.
- McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.

- McKnight TD, Lillis MT, Simpson RB (1987). Segregation of genes transferred to one plant from two *Agrobacterium* strains. *Plant Mol Biol* 8: 439-445.
- Meyer P (2000). Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Molec Biol* 43: 221-234.
- Meyer P, Saedler H (1996). Homology-dependent gene silencing in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 23-48.
- Miller J. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Mlynarova L, Nap JP (2003). A self-excising Cre recombinase allows efficient recombination of multiple ectopic heterospecific lox sites in transgenic tobacco. *Transgenic Res* 12: 45-57.
- Murai N, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta-Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Kemp JD, Hall TC (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222: 476-482.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Muskens MW, Vissers AP, Mol JN, Kooter JM (2000). Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43: 243-260.
- Nagy A (2003). Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* 26: 99-109.
- Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep* 19: 798-803.
- O'Kennedy MM, Burger JT, Botha FC (2004). Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. *Plant cell Rep* 22: 684-690.
- Odell JT, Russell SH (1994). Use of Site-Specific Recombination Systems in Plants. In: Paszkowski J (Hrsg.) *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*, Kluwer Acad Publ: 219-265.
- Odell JT, Caimi P, Sauer B, Russell SH (1990). Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 223: 369-378.
- Offringa R, de Groot MJ, Haagsman HJ, Does MP, van den Elzen PJ, Hooykaas PJ (1990). Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation. *EMBO J* 9: 3077-3084.

- Ohl S, Offringa R, van den Elzen PJM, Hoykaas PJJ (1994). Gene Replacement in Plants. In: Paszkowski J (Hrsg) Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants, Kluwer Acad Publ: 191-217.
- Onouchi H, Yokoi K, Machida C, Matsuzaki H, Oshima Y, Matsuoka K, Nakamura K, Machida Y (1991). Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res* 19: 6373-6378.
- Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C (1995). Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 247: 653-660.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6861-6865.
- Ow DW (2002). Rekombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol Biol* 48: 183-200.
- Pallotta MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker SJ (2000). RFLP mapping of manganese efficiency in barley. *Theor Appl Genet* 101: 1100-1108.
- Pawlowski WP, Somers DA (1998). Transgenic DNA integrated into oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12106-12110.
- Peerenboom E (1996). Die amylosefreie Kartoffel. Durch Gentechnik zu umweltfreundlichen, nachwachsenden Rohstoffen für die Industrie. MPIZ aktuell 1996/5, Internetseite des Max-Planck-Institutes Köln, <http://www.mpiz-koeln.mpg.de>.
- Perrin A, Buckle M, Dujon B (1993). Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO J* 12: 2939-2947.
- Plasterk RH, Ilmer TA, Van de Putte P (1983). Site-specific recombination by  $\text{Gin}$  of bacteriophage Mu: inversions and deletions. *Virology* 127: 24-36.
- Plessis A, Perrin A, Haber JE, Dujon B (1992). Site-Specific Recombination Determined by I-SceI, a Mitochondrial Group I Intron-Encoded Endonuclease Expressed in the Yeast Nucleus. *Genet* 130: 451-460.
- Puchta H (1999). Double-Strand Break-Induced Recombination Between Ectopic Homologous Sequences in Somatic Plant Cells. *Genet* 152: 1173-1181.
- Puchta H (2000). Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci* 5: 273-274.
- Puchta H (2003). Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision. *J Plant Physiol* 160: 743-754.
- Puchta H, Meyer P (1994). Substrat Specificity of Plant Recombinases Determined in Extrachromosomal Recombination Systems. In: Paszkowski J (Hrsg) Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants, Kluwer Acad Publ: 123-155.

- Puchta H, Dujon B, Hohn B (1993). Homologous recombination in plants cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. Nucl Acids Res 21: 5034-5040.
- Puchta H, Dujon B, Hohn B (1996). Two different but related mechanism are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5055-5060.
- Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow DW (1994) Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1796-1710.
- Ow DW, Calendar R, Thomason L (2001). DNA recombination in eukaryotic cells by the bacteriophage phiC31 recombination system. International patent filing, WO 01/07572.
- Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG (17.04.2001). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften: L106/1-38.
- Ringrose L Lounnas V, Ehrlich L, Buchholz F, Wade R, Stewart AF (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. J Mol Biol 27: 363-384.
- Russell SH, Hoopes JL, Odell JT (1992). Directed excision of a transgene from the plant genome. Mol Gen Genet 234: 49-59.
- Saedler H (1994). Gentechnologie und Landwirtschaft. Internetseite des Max-Planck-Institutes Köln. <http://www.mpiz-koeln.mpg.de>.
- Saedler H, Schuchert W (2001). Biotechnologie in der Pflanzenproduktion. In: Heiden S, Erb R, Burschel C (Hrsg.) Biotechnologie als interdisziplinäre Herausforderung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis F (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sauer B, Henderson N (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5166-5170.
- Schaefer DG (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. Annu Rev Plant Biol 53: 477-501.
- Schaefer DG, Zryd JP (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Plant J 11: 1195-1206.
- Schiestl RH, Petes TD (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 88: 7585-7589.
- Scholz S, Lörz H, Lütticke S (2001). Transposition of the maize transposable element Ac in barley (*Hordeum vulgare* L.). Mol Gen Genet 264: 653-661.

- Schütte G, Schmitz G (2001). Wissensstand zu den Auswirkungen spezieller gentechnisch vermittelter Eigenschaften - Herbizidresistenz. In: Schütte G, Stirn S, Beusmann V (Hrsg.) Transgene Nutzpflanzen. Sicherheitsforschung, Risikoabschätzung und Nachgenehmigungs-Monitoring. Birkhäuser Verlag, Basel: 102-122.
- Senecoff JF, Cox MM (1986). Directionality in FLP Protein-promoted Site-specific Recombination Is Mediated by DNA-DNA-Pairing. *J Biol Chem* 261: 7380-7386.
- Senecoff JF, Bruckner RC, Cox MM (1985). The FLP recombinase of the yeast 2- $\mu$ m plasmid: Characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7270-7274.
- Sonti RV, Tissier AF, Wong D, Viret JF, Signer ER (1995). Activity of the yeast FLP recombinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 28: 1127-1132.
- Soukharev S, Miller JL, Sauer B (1999). Segmental genomic replacement in embryonic stem cells by double lox targeting. *Nucleic Acids Res* 27: e21.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- Srivastava V, Ow DW (2001). Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. *Plant Mol Biol* 46: 561-566.
- Srivastava V, Anderson OD, Ow DW (1999). Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11117-11121.
- Srivastava V, Ariza-Nieto M, Wilson AJ (2004). Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice. *Plant Biotechnol J* 2: 169-179.
- Sternberg N, Hamilton D (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150: 467-486.
- Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R (1981). Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45: 297-309.
- Sternberg N, Sauer B, Hoess R, Abremski K (1986). Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol* 187: 197-212.
- Strickberger MW (1988). Genetik. Fachbuchverlag Leipzig.
- Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H (2000). A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J* 22: 461-469.
- Sunaga S, Maki K, Komagata Y, Ikuta K, Miyazaki JI (1997). Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of Cre recombinase in fertilized eggs. *Mol Reprod Dev* 46: 109-113.

- Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA (2002). Complex transgene locus structures implicate multiple mechanism for plant transgene reaarangement
- Sykes RB, Mathew M (1976). The beta-lactamase of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2: 115-157.
- Thomason LC, Calendar R, Ow DW (2001). Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage  $\phi$ C31 site-specific recombination system. *Mol Genet Genomics* 265: 1031-1038.
- Thorpe HM, Smith MCM (1998). *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5505-5510.
- Thykjaer T, Finnemann J, Schauser L, Christensen L, Poulsen C, Stougaard J (1997). Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant Molec Biol* 35: 523-530.
- Todd R, Tague BW (2001) Phosphomannose isomerase: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Molec Biol Rep* 19: 307-319.
- Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P (1998). The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theor Appl Genet* 96: 164-169.
- Van De Putte P, Cramer S, Giphart-Gassler M. (1980). Invertible DNA determines host specificity of bacteriophage mu. *Nature* 286: 18-22.
- Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JR (1985). A chimaeric hygromycin-resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol* 5: 299-302.
- Vergunst AC, Hooykaas PJ (1998). Cre/lox-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre. *Plant Mol Biol* 38: 393-406.
- Vergunst AC, Jansen LE, Hooykaas PJ (1998). Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 26: 2729-2734.
- Vergunst AC, Jansen LE, Fransz PF, De Jong JH, Hooykaas PJ (2000a). Cre/lox-mediated recombination in *Arabidopsis*: evidence for transmission of a translocation and a deletion event. *Chromosoma* 109: 287-97.
- Vergunst AC, Schrammeijer B, Den Dulk-Ras A, De Vlaam CM, Regensburg-Tuink TJ, Hooykaas PJ (2000b). VirB/D4-dependet protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290: 979-982.
- Vieira J, Messing J (1982). The pUC plasmid, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.

- Volkert FC, Broach JR (1986). Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast. *Cell* 46: 541-550.
- Volkert FC, Wu LC, Fisher PA, Broach JR (1986). Survival strategies of the yeast plasmid two-micron circle. *Basic Life Sci* 40: 375-396.
- Voziyanov Y, Pathania S, Jayaram M (1999). A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* 27: 930-941.
- Vries J De, Brandt P, Wackernagel W (2003). Dreizehnter Bericht nach Inkrafttreten des Gentechnikgesetzes für den Zeitraum vom 1.1.2002 bis 31.12.2002. Tätigkeitsbericht der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit im Jahr 2002. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 46: 514-525.
- Wakita Y, Otani M, Iba K, Shimada T (1998). Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Genes Genet Syst* 73: 219-226.
- Wetteronline. Wetterstatistik. Internetseite <http://www.wetteronline.de>.
- Wierzbicki A, Kendall M, Abremski K, Hoess R (1987). A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. *J Mol Biol* 195: 785-794.
- Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* 286: 481-486.
- Wright M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L (2001). Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as a selectable marker. *Plant Cell Rep* 20: 429-436.
- Yoder JI, Goldsbrough AP (1994). Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technology* 12: 263-267.
- Yu Y, Bradley A (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2: 780-790.
- Zhang P, Potrykus I, Puonti-Kaerlas J (2000). Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. *Transgenic Res* 9: 405-415.
- Zhang W, Subbarao S, Addae P, Shen A, Armstrong C, Peschke V, Gilbertson L (2003). Cre/lox-mediated marker excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor Appl Genet* 107: 1157-1168.
- Zhu YJ, Agbayani R, Moore PH. (2004). Green fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L.) transformation. *Plant Cell Rep* 22: 660-667.
- Zuo J, Niu QW, Moller SG, Chua NH (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnol* 19: 157-161.

---

35S	35S-rRNA des Blumenkohlmosaikvirus
<i>aadA</i>	Gen für die Adenyltransferase
Abb.	Abbildung
Ac	<i>Activator</i>
<i>aroA</i>	Gen für die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat Synthetase
attB	Bakterielle <i>attachment site</i>
attP	Phagen <i>attachment site</i>
<i>bar</i>	Gen für die Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferase
bzw.	beziehungsweise
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CSPD	Disodium 3-(4-meth-oxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan}-4-yl)phenyl Phosphat
<i>dao1</i>	Gen für die D-Aminosäureoxidase
DIG	Digoxigenin
d. h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
<i>et al.</i>	und andere (lat.)
EU	Europäische Union
F <sub>1</sub>	erste <i>filial</i> (lat. Tochter) Generation
F <sub>2</sub>	zweite <i>filial</i> (lat. Tochter) Generation
Flp	<i>Flipping DNA</i>
FRT	<i>FLP Recognition Target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gin	<i>G inversion</i>
gix	Erkennungssequenz der Gin-Rekombinase
GR	Glukokortikoidrezeptor
<i>gus</i>	Gen für die β-Glukuronidase
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
<i>hptII</i>	Gen für die Hygromycinphosphotransferase
HR	Homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
<i>ipt</i>	Gen für die Isopentenyl Transferase
IR	<i>Inverted Repeat</i>
loxP	<i>Locus of crossing over (X) of Bacteriophage P1</i>
LB	Luria-Bertani ( <i>broth</i> )
<i>nptII</i>	Gen für die Neomycinphosphotransferase

---

---

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>pat</i>	Gen für die Phosphinothricin- <i>N</i> -Acetyltransferase
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	<i>Recombinase</i> des Hefe-Rekombinationssystem
RS	<i>Recognition Site</i> von R
sec	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sog.	sogenannt
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
T <sub>0</sub>	Direktes transgenes Regenerat
T-DNA	<i>Transfer-DNA</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA
Ubi	Ubiquitin
<i>uidA</i>	Gen für die $\beta$ -Glukuronidase ( <i>gus</i> )
<i>vir</i>	Virulenzgene
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronsäure
<i>xyIA</i>	Gen für die Xylose-Isomerase
z. B.	Zum Beispiel
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit

## Einheiten

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
d	Tage
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
lx	Lux
m	Meter
M	Molar
min	Minute
Os	Osmol
Pa	Pascal
psi	<i>Pounds per square inch</i>
u	<i>Units</i>

---

08.03.1976	Geboren in Bergen / Rügen
1982-1986	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Saßnitz
1986-1990	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Rostock
1990-1994	Besuch des Gymnasiums Reutershagen in Rostock
1994	Erlangung des Abiturs, Gesamtnote 1,0
1994-1998	Studium der Biologie mit dem Abschlussziel Diplom an der Universität Rostock
1996	Erlangung des Vordiploms, Gesamturteil „Gut“
1999	Diplomarbeit mit dem Thema: „Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung in Tabak“ am Lehrstuhl Pflanzen- und Zellphysiologie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Inge Broer an der Universität Rostock
01/2000	Erlangung des Diploms, Prädikat „Ausgezeichnet“
01-07/2000	Wissenschaftliche Mitarbeit am Lehrstuhl Pflanzen- und Zellphysiologie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Inge Broer an der Universität Rostock
08/2000-01/2001	Anstellung am Wehrwissenschaftlichem Institut für Schutztechnologien - ABC-Schutz in Munster
02-05/2001	Anstellung im Handels- und Umweltschutzlabor Dr. Wiertz - Dipl. Chem. Eggert - Dr. Jörissen GmbH in Hamburg
12/2001-12/2004	Promotion in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie und Biotechnologie von Prof. Horst Lörz am Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg mit „sehr gut“