

**Transgen-Silencing in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*:
Ursachen und Mechanismen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniel Schubert

aus Köln

Copy-Repro-Center, Potsdam

2002

Berichterstatter: PD Dr. R. Schmidt
Prof. Dr. U.-I. Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Gen-Silencing in Pflanzen	1
1.2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)	2
1.3 Die biologische Rolle von PTGS	5
1.4 Transkriptionelles Gen-Silencing (TGS)	6
1.5 Methylierung, Chromatin und Silencing	7
1.6 Ein System zur Untersuchung von Transgen-Silencing in Pflanzen	9
1.7 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien und Enzyme	13
2.2 Medien	14
2.2.1 Medien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	14
2.2.2 Medien für die Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
2.2.3 Medien für die Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in axenischer Kultur	14
2.2.4 Medien für die Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	15
2.2.5 Medien für die Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i>	15
2.3 Verwendete Antibiotika-Konzentrationen	15
2.4 Oligonukleotide	15
2.5 Biologisches Material	17
2.5.1 Pflanzen	17
2.5.2 Bakterienstämme	17
2.5.3 Vektoren	17
2.6 Methoden	18
2.6.1 Wachstumsbedingungen der Pflanzen	18
2.6.2 Oberflächensterilisation von Samen	18
2.6.3 Agrobakterien-vermittelte Blattstückchentransformation von <i>N. tabacum</i>	19
2.6.4 Nomenklatur der Pflanzen	19

2.6.5	Präparation genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> und <i>N. tabacum</i>	20
2.6.6	Transfer von DNA auf Nylonmembranen („Southern Blot“) und Hybridisierung der Membranen.....	20
2.6.7	Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden.....	21
2.6.8	Präparation von RNA aus <i>A. thaliana</i>	21
2.6.9	Transfer von RNA auf Nylonmembranen („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membranen.....	22
2.6.10	iPCR zur Amplifikation von T-DNA-flankierenden Sequenzen.....	23
2.6.11	β -Glucuronidase-Aktivitätstests	23
2.6.12	Identifizierung von T-DNA-Insertionen in <i>Arabidopsis</i> Genen mittels reverser Genetik.....	25
2.6.13	DNA-Sequenzierungen.....	25
2.6.14	Datenbankanalysen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Verwendete T-DNA Konstrukte	26
3.2	Verwendete transgene <i>A. thaliana</i> Linien und Untersuchungen zu Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen	27
3.2.1	Verwendete transgene <i>A. thaliana</i> Linien	27
3.2.2	Untersuchungen zu Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen.....	30
3.3	Expressionsanalyse der SPT- und GUS-Reportergene in <i>A. thaliana</i>	35
3.3.1	Stabile und uniform hohe Expression des SPT-Gens in unabhängigen transgenen Pflanzen.....	35
3.3.2	Alle Kopien eines SPT-Gens tragen zu gleichen Teilen zur Expression bei	38
3.3.3	Gen-Silencing des SPT-Gens bei erhöhter SPT-Kopienzahl	39
3.3.4	Das Silencing der SPT-Gene beruht auf einem posttranskriptionellen Mechanismus	41
3.3.5	Zwei T-DNAs in invertierter Sequenzwiederholung zueinander, die SPT-Gene tragen, weisen hohe, stabile Expression der Reportergene auf	44
3.3.6	Silencing der GUS-Reportergene tritt bei einer niedrigeren Kopienzahl als bei SPT-Reportergenen auf.....	47
3.3.7	Hohe GUS-Expression in Linien mit weniger als drei GUS-Kopien unabhängig von der Konfiguration der GUS-Gene.....	51

3.3.8	Das Silencing der GUS-Gene wird durch Erhöhung der GUS-Transkript-Menge ausgelöst	52
3.3.9	Auch das Silencing der GUS-Gene beruht auf einem posttranskriptionellen Mechanismus	55
3.3.10	Das Silencing der GUS- und SPT-Gene wird bei unterschiedlichen Transkript-Mengen ausgelöst	61
3.4	Etablierung von transgenen <i>N. tabacum</i> Pflanzen und Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität	63
3.4.1	Identifizierung von transgenen <i>N. tabacum</i> Pflanzen, die nur eine intakte Kopie der T-DNA tragen	63
3.4.2	Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen <i>N. tabacum</i> Pflanzen	64
3.5	Untersuchungen zur Methylierung des GUS-Gens und zum Nachweis von GUS-siRNAs in Linien mit hoher GUS-Expression	68
3.5.1	Methylierung des GUS-Gens ist nicht vollständig meiotisch reversibel	68
3.5.2	siRNAs und Methylierung der GUS-Gene	75
3.6	Der Einfluss genetischer Modifikatoren auf posttranskriptionell stillgelegte GUS-Gene	76
4	Diskussion	81
4.1	Verwendete T-DNA-Konstrukte, Stabilität der Konstrukte und transgene <i>A. thaliana</i> Linien	81
4.2	Verringerte Transmission des Transformationsmarkers beruht auf Mutationen in essentiellen Genen	81
4.3	Analyse der Reporterexpression in <i>A. thaliana</i>	83
4.3.1	Stabile und hohe Expression von Reporter Genen mit geringer Kopienzahl.....	84
4.3.2	Positive Korrelation zwischen der Kopienzahl von Reporter Genen und ihrer Expression.....	85
4.3.3	T-DNAs, die als invertierte Sequenzwiederholungen zueinander vorliegen, haben keinen negativen Einfluss auf die Reporterexpression	86
4.3.4	Posttranskriptionelles Gen-Silencing bei erhöhter Kopienzahl von Reporter Genen durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen vermutlich Gen-spezifischen Schwellenwert	87
4.4	Analyse der GUS-Aktivität in <i>N. tabacum</i>	93
4.5	Partielle Aufrechterhaltung der Methylierung trotz meiotischer Reversion von PTGS.....	94

4.6	Der Einfluss genetischer Modifikatoren auf posttranskriptionell stillgelegte Transgene	96
4.7	Bedeutung dieser Arbeit für die Analyse von Transgen-Populationen	97
5	Zusammenfassung	99
6	Abstract	100
7	Literaturverzeichnis	101
8	Anmerkungen	115

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
b (kb, Mb)	Basen (Kilobasen, Megabasen)
BAP	6-Benzyladenin
bp (kbp, Mbp)	Basenpaare (Kilobasenpaare, Megabasenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Blumenkohlmosaikvirus
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
(d)NTP	(Desoxy-)Nukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
G	Guanin
GUS	β-Glucuronidase
„hemi“	für die T-DNA hemizygot
„homo“	für die T-DNA homozygot
HPT	Hygromycinphosphotransferase
iPCR	<i>inverse polymerase chain reaction</i>
LB	Linke Grenze der T-DNA („Left Border“)
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>
MAR	<i>matrix attachment regions</i>
min	Minute
Mops	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS-Medium	Murashige & Skoog Medium
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronsäure Trihydrat
N	beliebige Base
NAA	Naphtalenessigsäure
NPT	Neomycinphosphotransferase
nt	Nukleotide
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OCS	Octopinsynthase
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PC	Phenol-Chloroform
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	Positioneffektvariegation
PTGS	posttranskriptionelles Gen-Silencing

PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Rechte Grenze der T-DNA („Right Border“)
RdDM	<i>RNA-directed DNA-methylation</i>
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RIGS	<i>repeat induced gene silencing</i>
RIP	<i>repeat induced point mutation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAS	<i>systemic acquired silencing</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNAs	<i>small interfering RNAs</i> , kleine interferierende RNAs
SPT	Streptomycinphosphotransferase
T	Thymin
T-DNA	Transfer-DNA
TGS	transkriptionelles Gen-Silencing
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
VIGS	Virus induziertes Gen-Silencing
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

1 Einleitung

1.1 Gen-Silencing in Pflanzen

Transgene Pflanzen nehmen eine immer wichtigere Rolle in industriellen, landwirtschaftlichen und forschungsorientierten Applikationen ein. Für die Anwendung von transgenen Pflanzen sind neben der stabilen Integration des Transgens ins pflanzliche Genom dessen Expression und die Aktivität seines Genproduktes von grundlegender Bedeutung. Allerdings wird in den meisten Transgen-Populationen in unabhängigen Transformanten eine variierende, nicht vorhersagbare Expression des eingeführten Gens beobachtet. In vielen Fällen wurde sogar vollständige Abschaltung der Genexpression beschrieben (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998).

In einer repräsentativen Studie von Holtorf *et al.* (1995) wurde ein chimäres β -Glucuronidase-Transgen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in *A. thaliana* eingebracht. Messungen der Enzymaktivität ergaben bis zu 1000 fache Unterschiede in unabhängigen transgenen Linien. In einer anderen Untersuchung wurde ein Chalkonsynthase (*Chs*)-Transgen in Petunien eingebracht, das Sequenzhomologie zum endogenen *Chs*-Gen aufwies (Napoli *et al.* 1990). Unerwarteterweise führte dies nicht zu einer stärkeren Pigmentierung der Blüte, sondern zum Verlust der CHS-Expression in Blütensektoren oder sogar in der ganzen Blüte. Sowohl das *Chs*-Transgen als auch das endogene *Chs*-Gen waren also in diesen Bereichen inaktiviert. Daher wurde dieses Phänomen „Cosuppression“ genannt (Napoli *et al.* 1990). In diesen und vergleichbaren Untersuchungen war die verringerte oder vollständig abgeschaltete Expression des Transgens (und des endogenen Gens) nicht mit einem Verlust des Transgens oder einer Veränderung der DNA-Sequenz der betroffenen Gene korreliert. Dieses als „Gen-Silencing“ bezeichnete Phänomen beruht daher auf epigenetischen Mechanismen (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998, Flavell 1994). Epigenetik wird als „die Lehre von mitotisch und/oder meiotisch vererbaren Änderungen in der Ausprägung eines Gens, die nicht durch Veränderungen seiner DNA-Sequenz erklärt werden können“ definiert (Russo *et al.* 1996).

Anfangs wurde vermutet, dass Silencing nur ein Transgen-spezifisches Phänomen darstellt. Im Laufe der Zeit wurden allerdings mechanistische Gemeinsamkeiten von Transgen-induziertem Gen-Silencing und natürlichen epigenetischen Phänomenen entdeckt. Sie dienen vermutlich als Mechanismen der Genregulation und der Abwehr pathogener RNA und DNA. Zusätzliche Bedeutung gewinnt die Möglichkeit, mit Hilfe von Transgen-Silencing pflanzliche Gene zu inaktivieren (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001).

Zuerst wurde Transgen-Silencing bei der Untersuchung transgener Tabakpflanzen beschrieben, die verschiedene Antibiotikaresistenzgene trugen. Hier wurde eine negative Korrelation zwischen der Kopienzahl des Transgens und seiner Expression festgestellt (Matzke *et al.* 1989). In den folgenden Jahren wurde von Silencing verschiedenster Transgene berichtet (zusammengefasst in Flavell 1994).

Mechanistische Untersuchungen des Silencings von Transgenen zeigten, dass die Regulation auf verschiedenen Ebenen des genetischen Informationsflusses erfolgen kann. Wird eine Repression der Transkription beobachtet, bezeichnet man dies als transkriptionelles Gen-Silencing (TGS). TGS ist verbunden mit erhöhter Promotormethylierung und ist meiotisch nicht reversibel (Park *et al.* 1996, Assaad *et al.* 1993). Wird die mRNA eines Gens trotz Aufrechterhaltung der Transkriptionsrate abgebaut, spricht man von posttranskriptionellem Gen-Silencing (PTGS). PTGS wird in jeder Generation neu etabliert, nimmt im Laufe der Pflanzen-Entwicklung zu und verhält sich nicht wie ein klonales Ereignis (Dehio und Schell 1994, Jorgensen *et al.* 1996). Bei PTGS treten 21 bis 25 nt kleine RNAs mit Homologie zur transkribierten Sequenz des stillgelegten Gens auf (Hamilton und Baulcombe 1999). Weiterhin wird häufig Methylierung der transkribierten Sequenz festgestellt (English *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997).

1.2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS)

Erste Untersuchungen zu PTGS wurden mit einem 35S-*RolB*-Transgen auf einer T-DNA in *A. thaliana* Pflanzen von Dehio und Schell (1994) durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die Reversion des *RolB*- zum Wildtyp-Phänotypen im Laufe der Entwicklung der Pflanzen durch einen posttranskriptionellen Abbau der Transgen-mRNA verursacht wurde. Die Frequenz der Reversion variierte zwischen unabhängigen Transformanten, stieg aber mit erhöhter T-DNA-Kopienzahl an. Hinweise auf eine negative Korrelation zwischen Kopienzahl und Transgen-Expression konnten auch in anderen Untersuchungen erhalten werden (Hobbs *et al.* 1993, Jorgensen *et al.* 1996). In vielen Untersuchungen zeigte sich zudem stärkere Inaktivierung der Transgenexpression in Pflanzen, die das Transgen homozygot trugen, als in hemizygoten Pflanzen. Teilweise war PTGS sogar nur in homozygoten Pflanzen ausgeprägt (Elmayan und Vaucheret 1996, Dehio und Schell 1994, English *et al.* 1996). Nicht nur steigende Kopienzahl des Transgens, sondern auch Verwendung stärkerer Promotoren und die damit verbundene höhere Transkriptionsrate des Transgens führten zu einer größeren Anzahl an Pflanzen, die Silencing aufwiesen (Que *et al.* 1997).

Auch die häufig bei der Einbringung eines Transgens, dessen transkribierte Sequenz Homologie zu endogenen Genen aufweist, beobachtete koordinierte Inaktivierung von endogenem Gen und Transgen („Cosuppression“) beruht in den meisten Fällen auf PTGS (zu-

sammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Auch bei Cosuppression wurde in für das Transgen homozygoten Linien eine stärkere Ausprägung des Silencings als in hemizygoten Linien gefunden (de Carvalho *et al.* 1992, Dorlhac de Borne *et al.* 1994).

Diese Beobachtungen legen einen Dosiseffekt als einen Auslöser von PTGS nahe. Es besteht die Hypothese, dass eine bestimmte mRNA-Konzentration des Transgens bzw. des Transgens und des endogenen Gens überschritten werden muss, um PTGS auszulösen (Schwellenwert-Modell) (Vaucheret *et al.* 1998, Dehio und Schell 1994). Bereits in frühen Analysen wurde vorgeschlagen, dass durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) kleine, in *antisense*-Orientierung vorliegende RNAs synthetisiert werden, die durch Paarung mit der Transgen-mRNA den posttranskriptionellen Abbau der mRNA auslösen (Dougherty und Parks 1995). In *L. esculentum* konnte eine RdRP kloniert und die Aktivität, komplementäre RNAs zu synthetisieren, gezeigt werden (Schiebel *et al.* 1998). Inzwischen konnte durch Isolierung einer RdRP-Mutante aus *A. thaliana* eine Beteiligung einer RdRP an Transgen-Silencing bewiesen werden (Dalmay *et al.* 2000, Mourrain *et al.* 2000).

Aus Pflanzen mit einem posttranskriptionell inaktivierten Gen konnten 21 bis 25 nt kurze RNAs, bezeichnet als „small interfering RNAs“ (siRNAs), isoliert werden (Hamilton und Baulcombe 1999). Die siRNAs waren spezifisch für die transkribierte Sequenz von Genen, deren mRNA durch PTGS reduziert war. Sie lagen sowohl in *sense* als auch in *antisense* Orientierung vor. Auch in anderen Organismen wurden in Zusammenhang mit einem PTGS-vergleichbaren Mechanismus siRNAs nachgewiesen. Injektion von dsRNA führt in diesen Organismen zur sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) (zusammengefasst in Zamore 2001). In *C. elegans* konnte der Beweis erbracht werden, dass die siRNAs sowohl Abbauprodukt als auch „Primer“ für die RdRP-vermittelte Synthese von *antisense* RNA sind (Sijen *et al.* 2001). Zusätzlich konnte eine Beteiligung von zwei verschiedenen RdRPs an RNAi gezeigt werden. Sie wirken an unterschiedlichen Punkten von RNAi (Sijen *et al.* 2001). Im *A. thaliana* Genom liegen mindestens 6 RdRP-Gene vor (Mourrain *et al.* 2000). Daher ist auch die Beteiligung mehrerer RdRPs an PTGS in *A. thaliana* nicht ausgeschlossen.

Das Auslösen von PTGS bzw. Cosuppression durch promotorlose Konstrukte (van Blokland *et al.* 1994, Voinnet *et al.* 1998) lässt vermuten, dass das Schwellenwert-Modell keine allgemeingültige Erklärung für PTGS sein kann. Die häufig bei Transgen-Silencing beobachtete Methylierung der transkribierten Sequenz des inaktivierten Transgens könnte zu einer Produktion von aberranten mRNAs führen, die ihrerseits Silencing initiieren könnten. Aberrante Transkripte könnten auch durch die exzessive Produktion von mRNA oder durch Transkription von außergewöhnlichen DNA-Strukturen entstehen (zusammengefasst in Baulcombe 1996).

Die Expression von invertierten Sequenzwiederholungen konnte sehr effizient Silencing von Transgenen und endogenen Genen auslösen (Waterhouse *et al.* 1998, Chuang und Meyerowitz 2000, Mette *et al.* 2000). Die intramolekulare Paarung von mRNA könnte zu einer Erkennung und folgendem Abbau durch RNA-Doppelstrang-(dsRNA) spezifische RNasen führen. Durch die Paarung der Abbauprodukte mit intakter Transgen-mRNA und Abbau der dsRNA könnte der Prozess amplifiziert werden (Metzlaff *et al.* 1997). Die Expression von dsRNA imitiert die u.a. in *C. elegans* und *D. melanogaster* beobachtete RNA-Interferenz, die durch Injektion von dsRNA erreicht wird (zusammengefasst in Zamore 2001).

In *D. melanogaster* konnte eine ATP-abhängige Endonuklease („Dicer“) identifiziert werden, die injizierte dsRNAs und homologe endogene mRNAs zu siRNAs abbaut (Bernstein *et al.* 2001). Eine Mutation im orthologen Gen aus *A. thaliana* (*carpel factory*) führt zu erheblichen morphologischen Defekten (Jacobsen *et al.* 1999). Mechanistische Studien lassen vermuten, dass der Abbauprozess der mRNA auch in Pflanzen von Endonukleasen eingeleitet wird (Tanzer *et al.* 1997, Metzlaff *et al.* 1997, Han und Grierson 2002).

Alternativ zu einem RNA-vermittelten Auslösen von PTGS durch invertierte Sequenzwiederholungen wird diskutiert, dass die möglichen Sekundärstrukturen der invertierten Sequenzwiederholungen durch Faktoren, die Silencing auslösen, erkannt werden. Das Silencing könnte auf homologe Sequenzen durch Paarung der betroffenen DNA-Sequenzen *in trans* übertragen wird (zusammengefasst in Selker 1999). In vielen Studien wurde eine Beteiligung von invertiert zueinander vorliegenden T-DNAs an PTGS von Transgenen beschrieben (van Blokland *et al.* 1994, Jorgensen *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997, Hobbs *et al.* 1993). Auch in Untersuchungen der Gene für die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (PAI) in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass invertierte Sequenzwiederholungen Silencing auslösen können. Es konnte nachgewiesen werden, dass invertiert vorliegende PAI-Kopien im Ökotyp Wassilewskija einen Einfluss *in trans* auf die Methylierung und die Expression homologer PAI-Sequenzen, die ungekoppelt vorliegen, haben können (Bender und Fink 1995, Luff *et al.* 1999).

Eine Inaktivierung von Genen kann auch durch die Einbringung von *antisense* Konstrukten erfolgen. Die durch Einführung eines *antisense* Konstruktes erzeugte partielle Inaktivierung des *Chs*-Gens in Petunie verursachte vergleichbare Blüten-Phänotypen wie die Co-suppression des *Chs*-Gens (van der Krol *et al.* 1988, Napoli *et al.* 1990, Jorgensen *et al.* 1996). Das Auftreten von siRNAs legt nahe, dass *antisense* vermitteltes Gen-Silencing einem PTGS vergleichbaren Mechanismus unterliegt (Di Serio *et al.* 2001).

Wie bereits in den ersten Analysen zu PTGS in Petunien gezeigt werden konnte, wird PTGS des *Chs*-Gens in nicht klonalen Sektoren nachgewiesen (Napoli *et al.* 1990). In späteren Analysen in Tabak wurde ermittelt, dass sich PTGS systemisch und sequenzspezi-

fisch in der Pflanze ausbreitet. Dieses Phänomen wird als SAS („systemic acquired silencing“) bezeichnet (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet und Baulcombe 1997). Der Transport des Signals erfolgt von Zelle zu Zelle über Plasmodesmen und über längere Distanzen innerhalb der Pflanze durch das Phloem (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet *et al.* 1998). Zwar konnte das Signalmolekül noch nicht identifiziert werden, allerdings lässt die Sequenzspezifität eine RNA-Komponente vermuten, möglicherweise in einem Ribonukleoproteinkomplex. Auch RNA-Viren können sich innerhalb der Pflanze ausbreiten (zusammengefasst in Ueki und Citovsky 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass systemisch über das Phloem transportierte mRNA phänotypische Veränderungen in sich entwickelnden Geweben verursachen kann (Kim *et al.* 2001).

1.3 Die biologische Rolle von PTGS

Eine natürliche Funktion von PTGS besteht unter anderem in der Abwehr pathogener Elemente (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass von einem RNA-Virusstamm befallene Pflanzen nach einer Phase der Sensitivität Resistenz gegen diese Viren erlangen (Ratcliff *et al.* 1997, Al-Kaff *et al.* 1999). Eingeführte Transgene, die homologe Sequenzen zu RNA-Viren aufweisen, können Resistenz gegen diese verleihen (zusammengefasst in Baulcombe 1996). Es kann Virusresistenz vermittelt werden, wenn RNA-Viren eine homologe Sequenz zu einem posttranskriptionell stillgelegten Transgen besitzen (English *et al.* 1996). Umgekehrt kann PTGS eines Transgens durch eine Infektion mit einem RNA-Virus ausgelöst werden, der homologe Sequenzen zur transkribierten Sequenz eines Transgens aufweist (Ruiz *et al.* 1998, Al-Kaff *et al.* 1998). Dieses als „Virus-induziertes Gen-Silencing“ (VIGS) bezeichnete Phänomen ist häufig verbunden mit Auftreten von siRNAs von Virus und Transgen (Hamilton und Baulcombe 1999) und DNA-Methylierung des Transgens (Jones *et al.* 1998, 1999). Auch Viroid-RNA kann *de novo* Methylierung eines Transgens hervorrufen, das homologe Sequenzen zur Viroid-RNA besitzt (Wassenegger *et al.* 1994). VIGS wird nur beobachtet, wenn das Virus homologe Sequenzen zu Exons aufweist. Daher wird angenommen, dass die Degradierung der mRNA bei PTGS im Cytoplasma geschieht (Ruiz *et al.* 1998). Möglicherweise aktiviert die während der Replikation vorliegende Virus-dsRNA Silencing. Die Verbindung von PTGS mit Abwehrmechanismen gegen Viren wurde vor allem durch die Entdeckung viraler Proteine verstärkt, die den posttranskriptionellen Abbau von Virus-RNA und/oder Transgen-mRNA supprimieren. Eine Klasse von Proteinen kann PTGS revertieren und die Akkumulation von siRNAs verhindern (u.a. HC-Pro aus Potyviren; Mallory *et al.* 2001), eine weitere inhibiert die Initiation von Silencing (z.B. 2b aus Gurkenmosaikvirus; Brignetti *et al.* 1998) und die dritte hemmt die Ausbreitung des systemischen Signals (p25 aus

Kartoffelvirus X; Voinnet *et al.* 2000). Auch ein endogenes Gen aus Pflanzen supprimiert PTGS. Es weist Homologie zu einem Calmodulin auf (Anandalakshmi *et al.* 2000). Ebenso konnten durch EMS-Mutagenese zwei Loci in *A. thaliana* identifiziert werden, die eine Verstärkung von PTGS verursachen. Daher sind die betroffenen Proteine vermutlich ebenfalls Suppressoren von PTGS (Dehio und Schell 1994).

PTGS führt auch zur Unterdrückung der Transposition von mobilen genetischen Elementen. Eine Mutation in einem Gen einer für PTGS essentiellen RNA-Helicase aus *Chlamydomonas reinhardtii* führte zur Aktivierung von Transposons (Wu-Scharf *et al.* 2000). Ähnliches konnte für Proteine aus *C. elegans* gezeigt werden, die an RNA-Interferenz (RNAi) beteiligt sind (zusammengefasst in Zamore 2001).

Die Identifizierung von in PTGS involvierten Mutanten, die phänotypische Abnormalitäten aufweisen, legt nahe, dass PTGS auch in der natürlichen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt. Die Isolierung dieser Mutanten gelang in *C. elegans* (*ego1*, Smardon *et al.* 2000) und *A. thaliana* (*argonaute1*, Fagard *et al.* 2000, Morel *et al.* 2002).

1.4 Transkriptionelles Gen-Silencing (TGS)

TGS wurde in den meisten Untersuchungen nur bei einzelnen Individuen einer Transgen-Population beobachtet. In den meisten Fällen wurden in Zusammenhang mit einer transkriptionellen Inaktivierung der Transgen-Expression sehr komplexe Loci aus einigen zum Teil aberranten Transgen-Kopien gefunden (Mittelsten-Scheid *et al.* 1991, Park *et al.* 1996, Furner *et al.* 1998). In einer Untersuchung wurde beobachtet, dass in Tandem organisierte Transgene auf einer T-DNA, die als Einzelkopie vorliegt, transkriptionell abgeschaltet werden (Assaad *et al.* 1993, Ye und Signer 1996). Diese Form von Silencing wurde als RIGS („repeat-induced gene silencing“) bezeichnet. Es wurde vermutet, dass das Silencing durch Paarung homologer DNA-Sequenzen vermittelt wird (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998), ähnlich einem Mechanismus in *N. crassa*. In der sexuellen Entwicklung von *Neurospora* werden eingeführte Transgene, die in mehr als einer Kopie vorliegen, durch Punktmutationen stillgelegt. Dieser als RIP („repeat induced point mutation“) bezeichnete Prozess beruht vermutlich auf DNA-DNA-Interaktionen (zusammengefasst in Selker 1999).

Die transkriptionelle Inaktivierung eines Transgens, das in einer Kopie vorlag, wurde in einer Studie in Petunie nachgewiesen. Erklärt wurde dies durch die Integration der T-DNA in hoch methylierter genomischer DNA. Außerdem bestand ein deutlich unterschiedlicher GC-Gehalt von Transgen und umgebender genomischer Sequenz (Pröls und Meyer 1992). Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass zumindest einige der TGS-Phänomene RNA-vermittelt sind. Die Erzeugung von dsRNA des pNos-Promotors durch

Expression einer invertierten Sequenzwiederholung des pNos-Promotors führte *in trans* zu TGS von Genen, die unter der Kontrolle des pNos-Promotors standen (Mette *et al.* 2000). Dies war verbunden mit dem Auftreten von Promotormethylierung und siRNAs spezifisch für die pNos-Sequenz. TGS und Methylierung des Promotors kann auch durch Viren induziert werden, die Homologie zu einem Transgen-Promotor aufweisen (Al-Kaff *et al.* 1998, Jones *et al.* 1999). Virus-induziertes TGS wird im Gegensatz zu virus-induziertem PTGS meiotisch vererbt (Jones *et al.* 2001). DsRNA kann TGS oder PTGS auslösen, je nachdem, ob sie Sequenzhomologie zum Promotor oder der transkribierten Sequenz eines Gens besitzt (zusammengefasst in Vaucheret und Fagard 2001).

Eine weitere Verbindung zwischen TGS und PTGS konnte durch die Untersuchung von Silencing in Pflanzen hergestellt werden, die Mutationen im Gen einer Methyltransferase (*ddm2*) oder im *ddm1*-Gen, einem Homolog zu Chromatin-modifizierenden Proteinen, tragen (Jeddeloh *et al.* 1999). Mutationen in diesen Genen führten zur vollständigen Aufhebung von TGS (Mittelsten-Scheid *et al.* 1998, Morel *et al.* 2001). Auch PTGS wird zumindest in einem Teil der Pflanzen aufgehoben (Morel *et al.* 2001).

1.5 Methylierung, Chromatin und Silencing

In Pflanzen wird DNA-Methylierung von Cytosinen (C) unabhängig davon gefunden, ob 3' des C ein Guanin (G, CG-Methylierung), eine beliebige Base (N) und dann Guanin (CNG-Methylierung) oder nur beliebige Basen (CNN-Methylierung) folgen. CG- und CNG-Methylierung werden als symmetrische, CNN-Methylierung als asymmetrische Methylierung bezeichnet (zusammengefasst in Martienssen und Colot 2001).

Untersuchungen mit Viroiden zeigten, dass DNA-Methylierung RNA-vermittelt geschehen kann („RNA-directed DNA-methylation“, RdDM). Es wurden nur DNA-Sequenzen methyliert, die Homologie zur Viroid-RNA aufwiesen (Wassenegger *et al.* 1994). Posttranskriptionelles Transgen-Silencing (English *et al.* 1996, Elmayan und Vaucheret 1996), Virus-induziertes Gen-Silencing (Jones *et al.* 1999) und dsRNA-vermitteltes transkriptionelles Gen-Silencing (Mette *et al.* 2000) führen auch zu RdDM der homologen DNA-Sequenzen. In allen Fällen wurde symmetrische und asymmetrische Methylierung detektiert.

Der Transgen-Locus 271 aus Tabak kann TGS von Genen unter dem 35S Promotor und symmetrische und asymmetrische Methylierung des Promotors *in trans* auslösen. Sowohl Methylierung als auch TGS werden meiotisch vererbt (Park *et al.* 1996). In Untersuchungen mit einem 35S Promotor, der keine symmetrische Methylierung aufweisen konnte, da er keine CG- oder CNG-Di- bzw. Trinukleotide besaß, wurde Inaktivierung des Promotors *in trans* und asymmetrische Methylierung, ausgelöst durch den Locus 271, festgestellt

(Dieguez *et al.* 1998). Dies zeigte, dass symmetrische Methylierung nicht für die Initiation von TGS benötigt ist. Allerdings spielt sie für die Aufrechterhaltung von TGS eine wichtige Rolle, da meiotische Reversion von TGS gefunden wurde, wenn der induzierende Locus ausgekreuzt wurde (Dieguez *et al.* 1998). In Studien zu Virus-induziertem TGS wurde meiotische Vererbung von TGS und symmetrischer, aber nicht asymmetrischer Methylierung gefunden. Virus-induziertes PTGS und die damit verbundene Methylierung der codierenden Sequenz waren meiotisch reversibel (Jones *et al.* 2001). Allerdings ist die Bedeutung der Methylierung, zumindest bei PTGS nicht klar. PTGS wird in seltenen Fällen auch nachgewiesen, wenn keine Methylierung detektiert wird (Jones *et al.* 1999). In *C. elegans* wird PTGS trotz fehlender Methylierungsmechanismen gefunden (zusammengefasst in Zamore 2001). Auf der anderen Seite unterdrücken virale Proteine PTGS trotz weiterhin nachweisbarer Methylierung (Jones *et al.* 1999). Ebenso konnten Mutanten in *A. thaliana* isoliert werden, in denen eine Reaktivierung von transkriptionell (*mom1*, Amedeo *et al.* 2000) oder posttranskriptionell (*sde1*, *sde3* Dalmay *et al.* 2000, 2001, *sgs1*, *sgs2*, *sgs3*, *ago1* Morel *et al.* 2002) inaktivierten Genen, aber noch Methylierung der Gene detektiert wurde. In den Studien von Dalmay *et al.* (2000, 2001) und Morel *et al.* (2002) wurde allerdings nur CG-Methylierung der reaktivierten Gene nachgewiesen, während die posttranskriptionell stillgelegten Gene auch CNG- und CNN-Methylierung zeigten. Die Klonierung des Gens *mom1*, das für ein Chromatin-modifizierendes Protein kodiert, legt nahe, dass nicht die Methylierung, sondern die damit verbundene Chromatinstruktur wesentlich für Silencing ist (Amedeo *et al.* 2000). Das ebenfalls Chromatin-modifizierende Protein DDM1 ist an der Aufrechterhaltung von genomischer Methylierung und TGS beteiligt (Jeddeloh *et al.* 1999). DDM1 vermittelt vermutlich Methylierung, wohingegen MOM1 für die Inaktivierung der methylierten Gene verantwortlich ist (Martienssen und Colot 2001).

Kürzlich veröffentlichte Experimente deuten auf Chromatin-induzierte Methylierung von DNA hin (Lindroth *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002). In Epiallelen des *superman*-Locus (*clark kent*-Allele) aus *A. thaliana* wird Hypermethylierung (symmetrische und asymmetrische Methylierung) und Inaktivierung des *superman*-Gens gefunden (Jacobsen und Meyerowitz 1997). Es konnten zwei Mutanten identifiziert werden, in denen die epigenetische Inaktivierung aufgehoben war. In beiden Mutanten ist CNG-Methylierung fast vollständig und CG- und asymmetrische Methylierung teilweise reduziert. Die Klonierung der Gene ergab, dass ein Gen für eine Chromo-DNA-Methyltransferase (CMT3) codiert (Lindroth *et al.* 2001). Chromo-DNA-Methyltransferasen werden nur in Pflanzen gefunden. Sie besitzen eine Chromodomäne, die u.a. Interaktionen mit Chromatin vermittelt (zusammengefasst in Müller und Leutz 2001). Weitere Analysen zeigten, dass CMT3 *de novo* DNA-Methylierung katalysiert (Bartee *et al.* 2001). Das zweite Gen codiert für ein Homolog ei-

ner Histon-H3-Methyltransferase, die ebenfalls eine Chromodomäne besitzt (KRYPTONITE, Jackson *et al.* 2002). Mutationen in einem Homolog aus *Drosophila* unterdrücken das Silencing-Phänomen „Positioneffektvariegation“ (PEV, zusammengefasst in Karpen 1994). Ein weiteres an PEV-beteiligtes Protein aus *Drosophila* ist das „Heterochromatin Protein 1“ (HP1), dessen Chromodomäne spezifisch an das methylierte Lysin 9 des Histons H3 bindet (Lachner *et al.* 2001). *In vitro* Studien in *A. thaliana* konnten zeigen, dass die Chromodomäne eines HP1-ähnlichen Proteins (LHP1) aus *Arabidopsis* an das methylierte Lysin 9 des Histons H3 bindet. LHP1 interagiert wiederum *in vitro* mit CMT3 (Jackson *et al.* 2002). CNG-Methylierung ist also möglicherweise eine Folge von Methylierung des Lysin 9 des Histons H3. Pflanzen mit einer Mutation im CMT3- oder KRYPTONITE-Gen weisen keinen erkennbaren Phänotypen auf. Mutationen in anderen *Arabidopsis*-Genen, die Homologie zu Modifikatoren des Chromatin-Aufbaus aufweisen, wie *curly leaf* oder LHP1, verursachen allerdings dramatische morphologische Veränderungen (Goodrich *et al.* 1997, Gaudin *et al.* 2001). Die nachgewiesene Eigenschaft der Chromodomäne der Histon Acetyltransferase (MOF1), RNA zu binden, könnte einen Hinweis auf den Mechanismus von RNA-vermittelter DNA-Methylierung geben (Akhtar *et al.* 2000).

1.6 Ein System zur Untersuchung von Transgen-Silencing in Pflanzen

Die bisherigen Ausführungen machten deutlich, dass die Expression eines Transgens in einer Pflanze häufig sehr variabel und nicht vorhersagbar ist. Die Bestimmung der Faktoren, die Transgen-Silencing beeinflussen und auslösen, sollte einen wichtigen Beitrag liefern können, die variable Expression eines Transgens zu verringern und damit Bedingungen für eine stabile Transgenexpression zu ermitteln. Die Mechanismen der Inaktivierung der Transgen-Expression ähneln in vieler Weise endogenen Regulationsmechanismen. Daher können Untersuchungen von Transgen-Silencing auch Anteil an der Aufklärung endogener Regulationsmechanismen der Genexpression haben.

Mit den verfügbaren Pflanzen-Transformationstechniken sind die Kopienzahl des Transgens, das ins Genom einer transformierten Pflanze integriert wird, und die Integrationsstelle nicht steuer- und vorhersagbar (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). In den meisten Untersuchungen von Transgen-Silencing in Pflanzen konnte keine eindeutige Unterscheidung zwischen dem Einfluss der Kopienzahl des Transgens und der Genomposition des Transgens auf Silencing getroffen werden (Hobbs *et al.* 1993, Park *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997), wobei Hinweise auf eine negative Korrelation der Kopienzahl eines Transgens und seiner Expression vorlagen (Hobbs *et al.* 1993).

Mit Hilfe von Agrobakterien-vermittelter Transformation werden im Vergleich zu anderen Transformationsmethoden wesentlich geringere Kopienzahlen des Transgens eingebracht

und weniger komplexe Integrationen erzeugt (zusammengefasst in Tinland 1996). Daher sollten die für die Untersuchungen von Transgen-Silencing gewählten Pflanzenspezies mit *A. tumefaciens* transformierbar sein. Für die benötigten genetischen Untersuchungen sollten die verwendeten Arten durch Selbstbestäubung befruchtet werden können und eine kurze Generationszeit mit einer großen Zahl an Nachkommen haben. Weil in vielen Untersuchungen ein Einfluss der Genomstruktur auf die Expression eines Transgens vermutet wurde (Pröls und Meyer 1992, Holtorf *et al.* 1995), sollten sich die verwendeten Spezies erheblich in der Größe und Organisation ihrer Genome unterscheiden.

Für diese Analysen sind *A. thaliana* und *N. tabacum* ideal geeignet. Beide Pflanzenspezies sind leicht mit T-DNA zu transformieren, *A. thaliana* mit Hilfe von Agrobakterien-vermittelter Infiltration (Bechtold *et al.* 1993), *N. tabacum* mit Agrobakterien-vermittelter Blattstückchentransformation (Horsch *et al.* 1985).

A. thaliana hat aufgrund ihrer geringen Größe einen geringen Platzbedarf, weist eine kurze Generationszeit von etwa 8 Wochen auf und produziert bis zu 10000 Samen pro Pflanze (zusammengefasst in Meinke *et al.* 1998). Normalerweise erfolgt die Befruchtung durch Selbstbestäubung, allerdings können ohne größeren Aufwand Kreuzungen durchgeführt werden. *A. thaliana* besitzt mit einer Genomgröße von 125 Mb ein für höhere Pflanzen sehr kleines Genom, welches sich durch einen geringen Anteil repetitiver Elemente und eine hohe Gendichte auszeichnet. Das Genom ist mit Ausnahme einiger hoch repetitiver Bereiche vollständig sequenziert (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Die Kartierung des Integrationsortes von Transgenen, die für eine Untersuchung des Einflusses der Integrationsstelle eines Transgens auf seine Expression von grundlegender Bedeutung ist, ist daher relativ leicht möglich. Darüber hinaus können in *Arabidopsis* relativ leicht Mutationen erzeugt werden (zusammengefasst in Meinke *et al.* 1998). So wurden bereits einige Mutanten identifiziert, die eine Rolle bei Gen-Silencing Phänomenen spielen und für weitere Analysen dieses Phänomens von Bedeutung sind (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001).

In *Arabidopsis* bestehen sehr große Transgen-Populationen mit T-DNA- und Transposon-Insertionen (zusammengefasst in Azpiroz-Leehan und Feldmann 1997). Die Sequenzinformation des *Arabidopsis* Genoms kann durch die Methode der reversen Genetik daher zur Identifikation von Insertionen in Genen eingesetzt werden, die Homologie zu Genen aufweisen, bei denen eine Beteiligung an Silencing in anderen Organismen nachgewiesen wurde.

N. tabacum besitzt einen tetraploiden Chromosomensatz und ein etwa 30 fach größeres Genom als *A. thaliana* (Arugmuganathan und Earle 1991) mit deutlich höherem Anteil an repetitiven Sequenzen (Dean und Schmidt 1995). Tabak weist eine relativ kurze Generationszeit (ca. 12 Wochen) und eine große Zahl an Nachkommen auf. Im Gegensatz zu *A.*

thaliana sind in *N. tabacum* Untersuchungen zu systemischem Silencing (Palauqui *et al.* 1997) und Virus-induziertem Silencing möglich (Ruiz *et al.* 1998). Die meisten Untersuchungen zu Transgen-Silencing wurden in diesen beiden Spezies unternommen.

Vorhergehende Analysen konnten bereits zeigen, dass ein molekulargenetischer Ansatz zur Untersuchung von Transgen-Expression und –Silencing in *A. thaliana* wichtige Erkenntnisse liefert. Untersuchungen der Expression der β -Glucuronidase unter dem 35S Promotor in *A. thaliana* zeigten in 55 unabhängigen T-DNA Transformanten mit einer Kopie der T-DNA ausnahmslos hohe und stabile Expression des Transgens (Forsbach 2001, Gils 2000, Lechtenberg 1999, Schubert 1999). Ein bedeutender Einfluss des Integrationsortes des Transgens auf seine Expression konnte damit ausgeschlossen werden. Bei höheren Kopienzahlen wurde dagegen ausnahmslos eine erheblich geringere β -Glucuronidase-Expression gefunden (bis zu 5000 fach geringere Enzymaktivität) (Gils 2000, Lechtenberg 1999, Schubert 1999).

1.7 Zielsetzung

Diese Arbeit sollte wesentliche Beiträge zum Mechanismus von Transgen-Silencing in Pflanzen liefern.

Es sollte untersucht werden, ob die verringerte Transmission eines dominanten Markers in *A. thaliana* auf epigenetische Mechanismen zurückzuführen ist.

Transgene *Arabidopsis* Linien, in denen drei oder mehr Kopien des β -Glucuronidasegens (GUS) unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors vorliegen, zeigen Gen-Silencing (Lechtenberg 1999, Schubert 1999, Gils 2000). Um den Mechanismus, auslösende Faktoren und Vererbung des Silencings zu untersuchen, sollten molekularbiologische und genetische Experimente durchgeführt werden. Durch die Analyse der Expression eines weiteren Reportergens in *A. thaliana* und die Untersuchung der Expression des GUS-Gens in *N. tabacum* sollte überprüft werden, ob die erhaltenen Ergebnisse generelle Aussagen über Transgen-Expression und –Silencing erlauben und in Pflanzen mit unterschiedlicher Genomstruktur Gültigkeit haben.

In einem auf reverser Genetik basierenden Ansatz sollten T-DNA-Insertionen in *Arabidopsis* Genen identifiziert werden, die Homologie zu Modifikatoren von posttranskriptionellem Gen-Silencing aus anderen Organismen aufweisen, um die Expression posttranskriptionell inaktivierter Transgene in den identifizierten Linien analysieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Braunschweig:	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, Hybond-N ⁺ -Membran
Bio-Rad, Richmond, USA:	Bio-Rad Protein-Assay
Calbiochem Behring Corp., Bad Soden:	NP 40
Difco Laboratories, Augsburg:	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt, Pepton, Rindfleischextrakt
Duchefa, Haarlem, Niederlande:	BAP, Claforan, Diethylpyruvylcarbonat, Gelrite, Kanamycin, 4-MUG, MS-Medium M0222, MS-Medium+Vitamine M0245, NAA, Pflanzenagar, Rifampicin, Streptomycin, Tetracyclin, X-Gluc
Eurogentec, Seraing, Belgien:	Oligonukleotide
Fluka, Schweiz:	Formamid
Gibco BRL, Eggenstein:	Agarose, Oligonukleotide, Taq-Polymerase, Tris, RNase freie DNase I
Hartmann, Braunschweig:	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP
JT Baker, Holland:	Borsäure
Macherey & Nagel, Düren:	Nucleobond AX, Porablot NY Plus Membranen
MBI Fermentas, St.Leon-Roth:	BSA, Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerase (Klenow-Fragment), DNA-Längenstandard (GeneRuler TM 1kb DNA Leiter; <i>EcoRI/HindIII</i> gespaltene λ -DNA), λ -DNA, dNTPs, RNA-Längenstandard (Low range)
Metabion, Martinsried:	Oligonukleotide
MWG, Ebersbach:	Oligonukleotide
NEB, Bad Schwallbach:	T4-DNA Ligase (2000000 U/ml), <i>BstYI</i>
Pall, Dreieich:	Biodyne A-Membran
PeqLab Biotechnologie, Erlangen:	peqGOLD RNA Pure TM
Pharmacia, Freiburg:	Ficoll

Roche, Mannheim:	ATP, Restriktionsendonukleasen, High Pure PCR Purification Kit, High Pure Plasmid Purification Kit TM , p(dN) ₆ , RNase A
Serva, Heidelberg:	Bromphenolblau, Ethidiumbromid, MOPS, N-Lauroylsarcosin-Na-Salz, Triton-X-100, Xylencyanol
Sigma Chem. Co., Deisenhofen:	deionisiertes Formamid, Kodak-X-OMAT AR-5 Filme, 4-MU, PVP, Lachssperm-DNA
Whatman, Maidstone:	3MM Chromatographie-Papier

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2 Medien

Sämtliche Medien wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Vitamine, Antibiotika und Hormone wurden nach Bedarf nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.2.1 Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht erfolgte bei 37 °C ÜN.

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7 mit KOH
LB+Agar:	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar

2.2.2 Medien für die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Aufzucht erfolgte bei 28 °C

YEB-Medium:	0,5 % (w/v) Rindfleisch-Extrakt 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Saccharose 2 mM Magnesiumsulfat pH 7,2 mit NaOH
YEB+Agar:	YEB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

2.2.3 Medien für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in axenischer Kultur

MS-Medium (M0222) wurde von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen und mit 9 g/l Bacto-Agar versetzt.

AM:	0,23 % (w/v) MS-Medium (pH 6,0) mit 1% Saccharose
AG:	0,23 % (w/v) MS-Medium (pH 6,0) mit 0,8% (w/v) Glukose
MG:	0,46 % (w/v) MS-Medium (pH 5,8) mit 1,6% (w/v) Glukose

2.2.4 Medien für die Transformation von *Nicotiana tabacum*

MSO:	0,44 % (w/v) MS-Medium (M0245) (pH 5,7) mit 3 % (w/v) Saccharose
MSO+Agar:	MSO mit 0,8 % (w/v) Bacto-Agar
MSS(Kalli):	MSO mit 0,8 % (w/v) Pflanzenagar, 0,9 mg/l Thiamin-HCl, 50 mg/l Claforan, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 100 mg/l Kanamycin
MSS(Stecklinge):	MSO mit 0,3 % (w/v) Gelrite, 35 mg/l Claforan, 100 mg/l Kanamycin

2.2.5 Medien für die Anzucht von *Nicotiana tabacum*

MSO+Agar: siehe 2.2.4

2.3 Verwendete Antibiotika-Konzentrationen

Sofern nicht anders angegeben, wurden für Selektionsexperimente folgende Antibiotika-Konzentrationen verwendet:

a) in Bakterienkulturmedien:

Ampicillin:	100 µg/ml
Rifampicin:	100 µg/ml
Streptomycin:	200 µg/ml
Tetracyclin:	1 µg/ml (zur Selektion von <i>E. coli</i>) 10 µg/ml (zur Selektion von <i>A. tumefaciens</i>)

b) in Pflanzenselektionsmedien:

Kanamycin:	50 µg/ml für <i>A. thaliana</i> 200 µg/ml für <i>N. tabacum</i>
Streptomycin:	200 µg/ml

2.4 Oligonukleotide

Für die Herstellung von Sonden verwendete Oligonukleotide:

GUS5':	GUS-FOR: 5'-GCCGGGCAATTGCTGTGCCAGG-3'
	GUS-REV: 5'-CGCCTGTAAGTGCCTTGTGAG-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 950 bp
GUS3':	GUS 3' Rev: 5'-CGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'
	GUS B Rev: 5'-CTCAGCAAGCGCACTTACAGG-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 650 bp
OCS:	OCS-For: 5'-GAGCATGTGTAGCTCAGATCC-3'
	OCS-Rev: 5'-GCACCTTCCATAGTCCCTCG-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 750 bp
OCS-EX:	OCS-Ex-For: 5'-CCTGCTTTAATGAGATATGCGAG-3'
	OCS-Ex-Rev: 5'-GTACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 200 bp
SPT:	SPT-For: 5'-CCCACTCAAGCTGGATACTTCC-3'
	SPT-Rev: 5'-CCATAGCGTTTACGGCCAGATC-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 700 bp
	PCR mit 2 % DMSO

Ds3':	Ds3For:	5'-GATTGGGTAGCAGCATCTAGAA-3'
	Ds3Rev:	5'-CGGTCGGTAAAATACCTCTACC-3'
	Erwartete Produktlänge:	ca. 1100 bp
	PCR mit 5 % DMSO	
RB:	RB-Out:	5'-GACGGCAATTTTCGATGATGCAG-3'
	RB-B:	5'-GCCAGTCAGCATCATCACAC-3'
	Erwartete Produktlänge:	ca. 1000 bp
LB:	LB-B:	5'-CGACGTGTCTACATTCACGTC-3'
	NPT-out:	5'-GAACCTGCGTGCAATCCATC-3'
	Erwartete Produktlänge:	ca. 750 bp
HPT-Gen:	HPT 1:	5'-GACCTGATGCAGCTCTCGGA-3'
	HPT 2:	5'-CGCACTGACGGTGTCTCGTCCA-3'
	Erwartete Produktlänge:	ca. 500 bp
NPT-Gen:	NPT 1:	5'-AGACAATCGGCTGCTCTGAT-3'
	NPT 2:	5'-CCGCTCAGAAGAAGACTCGTCA-3'
	Erwartete Produktlänge:	ca. 750 bp
Actin 2/8:	ACTIN-FOR:	5'-TGTTGGTGATGAAGCACAATCC-3'
	ACTIN-R2:	5'-ACGACCTTAATCTTCATGCTGCT-3'
	Die Oligonukleotide binden an zwei Aktingene (<i>An et al.</i> 1996).	
	Erwartete Produktlänge der Aktingene 2 und 8:	ca. 700 bp

Für die iPCR verwendete Oligonukleotide:

Rechte Border (RB):	RB00:	5'-GTGGACCCTTGAGGAACTGGTAG-3'
	iPCRf1:	5'-CGGTGAGTAATATTGTACGGCTAAG-3'
	iPCRr1:	5'-CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG-3'

Die Kombinationen der Oligonukleotide RB00 und iPCRr1 oder iPCRf1 und iPCRr1 konnte für die Amplifikation von flankierenden genomischen Sequenzen an der RB verwendet werden.

Linke Border (LB):	LB5-long:	5'-GACCATCATACTCATTGCTGATCCATG-3'
	NPTiPCR:	5'-GGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC-3'

Für die Identifikation von T-DNA-Insertionen in *Arabidopsis*-Genen verwendete Oligonukleotide:

RNA-abhängige RNA-Polymerase (Akzessionsnr.: At4g11130):

3S-T22B4:	5'-GACTCCACAGACCACATCCAAATGAATG-3'
3SN-T22B4:	5'-CTCGACGGAGACCAGTTTTTTTGTAG-3'
4A-T22B4:	5'-GCTCTTCACAGCACGGTATAGTTTCC-3'
4AN-T22B4:	5'-CCAAACACAGACTCAGAGATGTATG-3'
T22B4-2000:	5'-GTGTGGATTGAGTCATGTCCCTTCTG-3'
TJ-LB1:	5'-GAACATCGGTCTCAATGCAAAAGGGGAAC-3'
TJ-RB1:	5'-GAATGGCGAATGAGACCTCAATTGCGAGC-3'

DNA Helicase recQ12 (Akzessionsnr.: At1g31360):

RecQ12-3S:	5'-CAATCAGCACCAACTTCCGAGAGAATTG-3'
RecQ12-3SN:	5'-GTGTACCTTGCTAAGGCTTCTTTAG-3'
RecQ12-4A:	5'-CTGAGTTTGTACCCAACTGTAACATCG-3'
RecQ12-4AN:	5'-CGTACTCTTTGATCCTTGGCTTGC-3'
MogLB1:	5'-AATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA-3'

Die mit T22B4 oder RecQ12 bezeichneten Oligonukleotide sind spezifisch für genomische *A. thaliana* Sequenzen. Die Oligonukleotide ...SN bzw. ...AN liegen 3' der Oligonukleo-

tide ...S bzw. ...A. PCR-Sonden für Hybridisierungen wurden mit einer Kombination der ...SN und ...AN-Oligonukleotide mit *A. thaliana* Wildtyp DNA hergestellt. Die Oligonukleotide TJ-RB1, TJ-LB1 und MogLB1 sind spezifisch für T-DNA-Bordersequenzen.

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Pflanzen

Arabidopsis thaliana: Ökotyp Columbia (Inventarnummer CS3180 des *Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC).

Nicotiana tabacum: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

2.5.2 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α (Hanahan 1983):

Dieser Stamm wurde zur Klonierung und zum Erhalt der Hochkopienzahl-Plasmide verwendet.

E. coli SURETM 2 (Firma Stratagene):

Dieser Stamm wurde zur Klonierung und zum Erhalt der T-DNA-Vektoren verwendet.

A. tumefaciens LBA 4404 (Hoekema *et al.* 1983):

Dieser nicht onkogene Stamm besitzt Streptomycin- und Rifampicin-Resistenzen und wurde zur Pflanzen-transformation verwendet.

2.5.3 Vektoren

a) Hochkopienzahl-Plasmide

Die verwendeten Plasmide für das GUS-Gen (SLJ4D4) sowie für das SPT-Gen (SLJ1491) sind Derivate des Vektors pUC118 (Jones *et al.* 1992). Alle verwendeten Hochkopienzahl-Plasmide vermitteln Ampicillin-Resistenz.

b) T-DNA-Plasmide

Die binären T-DNA-Vektoren sind Derivate des Plasmids SLJ7292 (Jones *et al.* 1992). Sie tragen ein Tetracyclin-Resistenzgen.

2.6 Methoden

Alle gängigen molekularbiologischen Techniken wurden, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, entsprechend den Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.6.1 Wachstumsbedingungen der Pflanzen

In der Regel wurden die Pflanzen zunächst in Sterilkultur auf Agarplatten in der Klimakammer angezogen und nach ca. zwei Wochen in Erde oder Reagenzgläser mit Medium überführt.

Da die Promotionsarbeit in zwei verschiedenen Instituten erfolgte, unterschieden sich die Wachstumsbedingungen der Pflanzen.

Die Versuche wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Langtagbedingungen im Gewächshaus und in der Klimakammer für *A. thaliana*:

MDL in der MPG, Köln:	16 h Licht bei 20 °C, 8 h Dunkel bei 18 °C, Luftfeuchtigkeit jeweils 70 %
MPI für molekul. Pflanzenphysiologie, Golm:	6 h Licht bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 80 % 8 h Dunkel bei 18 °C, Luftfeuchtigkeit 50 %

Kurztagbedingungen in der Klimakammer für *A. thaliana*:

MDL in der MPG, Köln:	9 h Licht bei 20 °C, 15 h Dunkel bei 18 °C, Luftfeuchtigkeit jeweils 70%
MPI für molekul. Pflanzenphysiologie, Golm:	8 h Licht bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 60 % 16 h Dunkel bei 16 °C, Luftfeuchtigkeit 75 %

Langtagbedingungen im Gewächshaus und in der Klimakammer für *N. tabacum*:

MDL in der MPG, Köln:	Gewächshaus wie <i>A. thaliana</i> , Klimakammer 16 h Licht bei 24 °C, 8 Dunkel bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 70 %
MPI für molekul. Pflanzenphysiologie; Golm:	16 h Licht bei 26 °C, 8 h Dunkel bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 60-70 %

Die unterschiedlichen Bedingungen in beiden Forschungsinstituten führten, soweit dies Testreihen zeigen konnten, zu vergleichbaren Ergebnissen. Unter den Kurztagbedingungen im MPI für Pflanzenphysiologie in Golm blühten die *A. thaliana* Pflanzen allerdings etwa 1-2 Wochen später als unter den Kurztagbedingungen im MDL in der MPG in Köln.

2.6.2 Oberflächensterilisation von Samen

Die Sterilisation von bis zu 500 Samen erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Dabei wurden die Samen zunächst 5 min in 70 %igem Ethanol und anschließend 5 min in einer 0,84 %igen Natriumhypochloridlösung geschwenkt. Es folgten zwei Waschstufen mit sterilem Wasser.

2.6.3 Agrobakterien-vermittelte Blattstückchentransformation von *N. tabacum*

Der zu transformierende Agrobakterien-Stamm wurde bei 28 °C für 24 h auf YEB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Bakterien wurden in MSO-Medium suspendiert.

Die Transformation von Tabak erfolgte nach Horsch *et al.* (1985). Für die Transformation wurden Blätter von 3-4 Wochen alten, in axenischer Kultur gezogenen *N. tabacum* Pflanzen verwendet. 8-10 mm² große Explantate von Tabakblättern (keine Mittelrippen) wurden 10-30 min in der Agrobakterien-Suspension bei RT inkubiert, kurz auf Filterpapier und dann mit der Oberseite nach unten auf MSO-Platten bei 24 °C im Dunkeln gelegt. Nach zwei Tagen wurden die Blattstücke auf MSS (Kalli) transferiert. Dies wurde alle zwei Wochen wiederholt. Entstehende Sprosse wurden von den Kalli abgetrennt und auf MSS (Stecklinge) gesetzt. Nach der Bildung von Wurzeln konnten die Pflanzen in Erde gesetzt und ins Gewächshaus transferiert werden.

2.6.4 Nomenklatur der Pflanzen

Die einzelnen transgenen Pflanzen sind nach dem T-DNA-Konstrukt bezeichnet, mit dem sie transformiert wurden.

a) *A. thaliana*

Transformanten, die aus Agrobakterien-vermittelte Wurzeltransformation hervorgegangen sind (Valvekens *et al.* 1988), wurden mit Zahlen von eins an aufwärts bezeichnet. Aus Vakuuminfiltrationen (Bechtold *et al.* 1993) hervorgegangene Pflanzen sind dagegen ab 100 aufwärts bezeichnet. Allgemein wurden Nachkommen, die in Reagenzgläsern gezogen wurden, zusätzlich mit einer Ziffer ab 21 aufwärts bezeichnet. Für im Gewächshaus kultivierte Pflanzen gilt Entsprechendes ab der Ziffer 11. Für jede nachfolgende Generation wurde eine weitere Nummer gemäß den Anzuchtbedingungen zugefügt. Für die T-DNA hemizygote Nachkommen wurden zusätzlich mit „hemi“, homozygote Nachkommen mit „homo“ bezeichnet.

b) *N. tabacum*

Transformanten aus der Agrobakterien-vermittelten Blattstückchen-Transformation wurden mit Zahlen von eins an aufwärts bezeichnet. Zum Teil wurden mehrere Sprosse den entstehenden Kalli abgenommen und bewurzelt. Diese bekamen neben der Transformanten Nummer noch eine Zahl von eins an aufwärts (z.B. Gus 3xr 39-1).

2.6.5 Präparation genomischer DNA aus *A. thaliana* und *N. tabacum*

Die Präparation erfolgte nach einem vereinfachten Protokoll von Dellaporta *et al.* (1983).

Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8
50 mM EDTA, pH 8
500 mM NaCl
1,65 % (w/v) SDS
unmittelbar vor Gebrauch 0,07 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugeben

200-500 mg Blattmaterial wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in einem Reaktionsgefäß homogenisiert. Nach Zugabe von 650 μ l des Reaktionspuffers wurde gemischt. Anschließend erfolgte ein zehninütiger Inkubationsschritt bei 65 °C. Nach Zentrifugation des Homogenats wurde der Überstand mit einem Volumen PC (Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1) extrahiert und die entstandene wässrige Oberphase mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation. Die DNA wurde i. Allg. in 50 μ l H₂O/RNase (0,1 mg/ml) resuspendiert. Mit dieser Methode können ca. 5 μ g genomischer *Arabidopsis* DNA pro Präparation erhalten werden. Zur Isolierung von Tabak-DNA wurde ein zusätzlicher Chloroform-Extraktionsschritt durchgeführt. Es wurden bis zu 20 μ g Tabak-DNA pro Präparation erhalten.

Für Southern-Blot-Analysen wurde jeweils die Hälfte der DNA einer Präparation eingesetzt.

2.6.6 Transfer von DNA auf Nylonmembranen („Southern Blot“) und Hybridisierung der Membranen

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Southern (1975). Die Transfer- und Hybridisierungsbedingungen richteten sich nach den entsprechenden Herstellerangaben.

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach vierstündiger Vorhybridisierung bei 65 °C über Nacht in einer Glasröhre im Rolleninkubator Heraeus HeraHybrid. Die Membran wurde in der Regel zweimal 30 min bei 60-65 °C gewaschen.

Lösungen: 100 x Denhardt´s: 2 % (w/v) BSA
2 % (w/v) Ficoll
2 % (w/v) PVP
Hybridisierungslösung: 5 x Denhardt´s
5 x SSPE
0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung: 2 x SSPE
0,1 % (w/v) SDS

2.6.7 Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von Sonden erfolgte nach einem Protokoll von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984).

Lösungen:	Lösung O:	0,125 M Tris/HCl, pH 8 0.125 M MgCl ₂
	Lösung A:	1 ml Lösung O 18 µl β-Mercaptoethanol 5 µl dATP, 5 µl dGTP, 5 µl dTTP (je 100 mM Stammlösung)
	Lösung B:	2 M Hepes/NaOH, pH 6,6
	Lösung C:	p(dN) ₆ 90 OD ₂₆₀ /ml
	5 x Markierungspuffer:	200 µl Lösung A 500 µl Lösung B 300 µl Lösung C

Die radioaktiv zu markierende Sonde (20-100 ng in 16 µl) wurde nach 10 minütiger Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5 µl 5 x Markierungspuffer, 1 µl Klenow-Enzym (2 U) und 30 µCi ³²α-dCTP zugefügt. Die Reaktion wurde mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Proben wurden mit dem High Pure PCR Product Purification KitTM der Firma Roche (Mannheim) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat wurde 10 min bei 95 °C denaturiert, 2 min auf Eis gestellt und in 15 ml Hybridisierungslösung zu der vorhybridisierten Membran gegeben.

2.6.8 Präparation von RNA aus *A. thaliana*

Die Präparation von RNA aus Blättern von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe des PeqGOLD-RNAPureTM Kits der Firma PeqLab Biotechnologie (Erlangen). Es wurde gemäß Herstellerangaben verfahren. Zur Präparation wurden ca. 60 mg Blattmaterial eingesetzt. Mit dieser Präparationsmethode konnten bis zu 100 µg RNA gewonnen werden.

Für die Isolierung von kleinen RNAs wurden Änderungen zum Herstellerprotokoll vorgenommen. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20 °C für 20 min. Auf einen Waschschrift wurde verzichtet.

2.6.9 Transfer von RNA auf Nylonmembranen („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membranen

a) Probenaufbereitung:

Lösungen: 10 x Elektrophoresepuffer: 0,2 M Mops, pH 7
80 mM Natriumacetat
10 mM EDTA, pH 8
zuerst Natriumacetat in DEPC-H₂O ansetzen,
nach dem Autoklavieren Mops darin lösen, dann
DEPC-behandeltes EDTA dazugeben; nach Sterilfiltration dunkel bei RT aufbewahren

10 x RNA-Blaumarker: 50 % (v/v) Glycerol
1 m M EDTA, pH 8
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol

Die isolierte RNA wurde in 20-50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Es wurden 10 x Elektrophoresepuffer sowie deionisiertes Formamid und Formaldehyd hinzugegeben. Die Endkonzentrationen im Ansatz betragen 10 % für den 10 x Elektrophoresepuffer, 40 % für Formamid und 2,2 M für Formaldehyd. Es folgte ein 10 minütiger Denaturierungsschritt bei 80 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1,5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) und 10 x RNA Blaumarker konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

b) RNA Elektrophoresegele

Die Agarose-Konzentration der Gele betrug 1,2-1,5 % (w/v). Sie wurden mit 2,2 M Formaldehyd angesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei 20 V über Nacht.

Für die Auftrennung von kleinen RNAs wurden 2-2,5 %ige (w/v) Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde 1 h bei 100 V und 1 h bei 20 V durchgeführt. Nach Abtrennen des Gelstücks mit den niedermolekularen RNAs wurde die Polung der Gelkammer vertauscht, um die hochmolekularen RNAs aufzutrennen. Die Elektrophorese erfolgte nun für 2 h bei 100 V, anschließend über Nacht bei 20 V.

c) Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Die RNA wurde auf HybondN⁺-Nylonmembranen (Amersham, Braunschweig) transferiert, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

d) Hybridisierung der RNA-Membranen

Lösungen: Hybridisierungspuffer nach Church und Gilbert (1984):

7 % (w/v) SDS
0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2
1 mM EDTA

Waschlösungen:

6 x SSPE, 0,5 % SDS
4 x SSPE, 0,5 % SDS
2 x SSPE, 0,5 % SDS
2 x SSPE, 0,1 % SDS

Die RNA-Membranen wurden bei 68 °C 30 min prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 58°C über Nacht. Zur Detektion von siRNAs wurden die Membranen bei 58 °C prähybridisiert und bei 42 °C über Nacht hybridisiert. Die Membranen wurden je 5 min bei RT mit 6 x SSPE, 0,5 % SDS, 4 x SSPE, 0,5 % SDS und 2 x SSPE, 0,5 % SDS gewaschen. Die Membranen mit hochmolekularen RNAs wurden zusätzlich 30 min bei 60 °C mit 2 x SSPE, 0,1 % SDS, die Membranen mit siRNAs 15 min bei RT mit 2 x SSPE, 0,1 % SDS gewaschen.

2.6.10 iPCR zur Amplifikation von T-DNA-flankierenden Sequenzen

Die inverse PCR wurde gemäß einem veränderten Protokoll von Ochman *et al.* (1988) durchgeführt. Zur Amplifikation von T-DNA-flankierenden Sequenzen wurde zunächst die genomische Pflanzen-DNA mit *Bst*YI gespalten. Anschließend erfolgte eine Ligationreaktion in großem Volumen und PCR auf den entstehenden Zirkeln. Durch die Wahl der Oligonukleotide konnte nur zirkularisierte DNA, die T-DNA-Endsequenzen enthielten, amplifiziert werden. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.4 aufgeführt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurde sequenziert und auf Homologie zum *A. thaliana* Genom hin untersucht (2.6.14). Es wurden Oligonukleotide aus der flankierenden genomischen Sequenz abgeleitet. Der Integrationsort der T-DNA konnte bestätigt werden, wenn diese Oligonukleotide mit einem LB- bzw. RB-Oligonukleotid in einer PCR ein Produkt ergaben.

2.6.11 β -Glucuronidase-Aktivitätstests

a) Semiquantitativer β -Glucuronidase-Aktivitätstest

Lösungen: 0,5 M Natriumphosphatpuffer:	0,5 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7
X-Gluc-Lösung:	50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 1 mM EDTA, pH 8 0,1 % (v/v) Triton-X-100 1 mM X-Gluc

Die Färbung der Blattstücke erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Inkubation erfolgte in 96er Mikrotiterplatten, in die in jede Vertiefung 100 µl X-Gluc-Puffer vorgelegt wurden. Die Stärke der Blaufärbung der Lösung und der Blattstücke ist ein Maß für die GUS-Aktivität.

b) Quantitative β -Glucuronidase-Aktivitätstests

Der quantitative β -Glucuronidase-Aktivitätstest erfolgte nach Jefferson et al. (1987).

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mit dem Bradford-Reagenz der Firma Bio-Rad nach Herstellerangaben. Die Messung wurde bei OD₅₉₅ im Photometer durchgeführt. Zur Aufstellung einer Eichgeraden wurden BSA-Konzentrationen von 1 bis 20 µg/ml verwendet.

Das Fluorimeter VersaFluor™ der Firma Bio-Rad (Richmond, USA) wurde mit einer Eichgerade von 50 nM bis 5 µM 4-MU (Verdünnung in 0,2 M Na₂CO₃) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm geeicht.

Von jeder transgenen Linie bzw. Pflanze wurden, falls nicht anders angegeben, zwei Proteineextrakte erstellt. Von den beiden Extrakten wurden jeweils zwei Aliquots unabhängig gemessen. Aus diesen vier Messungen wurde der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung wurde mit der Formel $((n\sum x^2 - (\sum x)^2)/n^2)^{0,5}$ berechnet.

Die Gus-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

Gus-Aktivität [pmol 4-MU/min/mg Protein] =

$$\frac{4 \cdot 10^6 \cdot B \cdot m_1 \cdot F \cdot (E_{455} - E_{455}^0 - b_2)}{D \cdot C \cdot m_2 \cdot A \cdot (OD_{595} - b_1)}$$

wobei:	A:	eingesetzte µl der Verdünnung
	B:	Verdünnung (1:B)
	C:	Reaktionszeit [min]
	D:	im Fluorimeter gemessenes Volumen [ml]
	F:	eingesetztes Volumen in der Proteinbestimmung [µl]
	E ₄₅₅ :	gemessene Fluoreszenz der Probe nach C Minuten
	E ₄₅₅ ⁰ :	gemessene Fluoreszenz des Nullwertes nach C Minuten
	OD ₅₉₅ :	gemessene Extinktion bei der Proteinmessung
	m ₁ :	Steigung der Proteineichkurve [ml/µg]
	b ₁ :	Schnittpunkt der Proteineichkurve mit der y-Achse
	m ₂ :	Steigung der 4-MU-Eichkurve [1/nmol]
	b ₂ :	Schnittpunkt der 4-MU-Eichkurve mit der y-Achse

2.6.12 Identifizierung von T-DNA-Insertionen in *Arabidopsis* Genen mittels reverser Genetik

Mit Hilfe von reverser Genetik ist es möglich, Insertionen in Genen zu identifizieren, deren Sequenz bekannt ist (zusammengefasst in Azpiroz-Leehan und Feldmann 1997). Diese Methode wurde im Labor von Dr. Burkhard Schulz im Max-Delbrück-Laboratorium in der MPG in Köln durchgeführt. Die T-DNA-Linien wurden aus dem „Nottingham *Arabidopsis* Stock Center“ bezogen. Die DNAs der einzelnen Linien lagen bereits präpariert vor. Jede PCR Reaktion wurde auf einem Gemisch von DNAs von 1000 unabhängigen T-DNA-Linien durchgeführt (1000er Pool). Insgesamt konnten so 73940 Linien auf eine Integration einer T-DNA in einem bestimmten Gen getestet werden. Die PCR-Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (2.6.6) und die Membranen mit genspezifischen Sonden hybridisiert (2.4). Wurde ein PCR-Produkt bzw. eine Hybridisierung in einem 1000er Pool erhalten, so wurden PCR-Reaktionen auf Subpools durchgeführt, die jeweils DNAs von 100 Linien des 1000er Pools enthielten. Weitere PCR-Reaktionen wurden auf 10er Subpools der 100er Subpools ausgeführt. Samen des 10er Pools wurden im Gewächshaus ausgesät. Die DNAs der resultierenden Pflanzen wurden präpariert und für PCR-Analysen eingesetzt. So konnten Einzelpflanzen identifiziert werden, die eine Insertion in dem gewünschten Gen enthielten. Weitere PCR-Reaktionen ermöglichten die Identifikation von Pflanzen, in denen die T-DNA hemizygot oder homozygot vorlag.

2.6.13 DNA-Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der ADIS-Einheit (Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung) des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung, Köln, durchgeführt. Verwendet wurden PE/Applied Biosystems 377 Sequenzierer mit BigDye-Terminator-Chemikalien. Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersbach), Gibco BRL (Eggenstein), Eurogentec (Seraing, Belgien) und Metabion (Martinsried) bezogen.

2.6.14 Datenbankanalysen

Die Suche von homologen Sequenzen wurde mit Unterstützung des BLAST-Programms (Altschul *et al.* 1990) in der *A. thaliana* Datenbank durchgeführt (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/AtDB/nph-blast2atdb> bzw. <http://arabidopsis.org/blast>). Es wurde die Option „GenBank“, die alle Sequenzen von *Arabidopsis* umfasst, zur Suche benutzt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, von welchen Faktoren Gen-Silencing in *A. thaliana* und in gewissen Punkten auch in *N. tabacum* ausgelöst bzw. beeinflusst wird. Hierzu wurden Pflanzen mit verschiedenen T-DNA-Konstrukten, die ein oder mehrere identische Reporterengkassetten trugen, analysiert.

Die verwendeten T-DNA Konstrukte werden in 3.1 vorgestellt. In 3.2 werden die etablierten transgenen *A. thaliana* Pflanzen und eine Untersuchung der Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen, präsentiert. In 3.3 ist eine detaillierte Expressionsanalyse und die Untersuchung von Gen-Silencing für zwei verschiedene Reporter Gene dargestellt. Die für *N. tabacum* erhaltenen Aktivitätsmessungen sind in 3.4 zusammengefasst. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Methylierung des GUS-Gens und zum Nachweis von GUS-siRNAs in Linien mit hoher GUS-Expression durchgeführt (3.5). In 3.6 ist der Einfluss genetischer Modifikatoren auf posttranskriptionell stillgelegte GUS-Gene beschrieben.

3.1 Verwendete T-DNA Konstrukte

Zur molekulargenetischen Untersuchung von Gen-Silencing-Phänomenen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit transgenen *A. thaliana* und *N. tabacum* Pflanzen gearbeitet, in die mit Hilfe von Agrobakterien-vermittelter Transformation T-DNAs eingebracht worden waren. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Konstrukte dargestellt. Diese enthielten zwei verschiedene Reporter Gene, ein chimäres β -Glucuronidasegen (GUS, Jefferson *et al.* 1987) oder ein chimäres Streptomycinphosphotransferasegen (SPT, Jones *et al.* 1989). Beide Gene stehen unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (Odell *et al.* 1984) und tragen das 3'-Ende des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens* (OCS, Gielen *et al.* 1984). Zur Untersuchung des Einflusses der Kopienzahl eines Transgens auf seine Expression waren Konstrukte erstellt worden, in denen ein bis drei Kopien der o.a. Reporter Gene mit den erwähnten regulatorischen Sequenzen in Tandem vorlagen.

Alle T-DNAs tragen ein Neomycinphosphotransferasegen (NPT, Matsumura *et al.* 1984) als Transformationsmarker.

Eine Transposition der verschiedenen Reporter Gene in den unterschiedlichen Kopienzahlen sollte mit Hilfe des *Ac/Ds*-System aus Mais (McClintock 1951), das heterolog in *A. thaliana* etabliert wurde (Bancroft *et al.* 1992), möglich sein. Daher wurden die Reporterengkassetten in ein Derivat des *Ac*-Elementes kloniert (*Ds*). Dieses Element ist nicht zur autonomen Transposition fähig, kann aber mittels einer Transposasequelle ($\Delta NaeI$ sAc,

Bancroft *et al.* 1992) transaktiviert werden. Um die Exzision des *Ds*-Elementes nachweisen zu können, wurde es in den 5'-untranslatierten Bereich eines Hygromycinphosphotransferasegens (Malpartida *et al.* 1983) kloniert. Die Transposition des *Ds*-Elementes führt zur Expression des Gens durch den p1'-Promotor und damit zu Hygromycinresistenz (Baker *et al.* 1987).

Die verschiedenen Reportergenkonstrukte unterschieden sich nur in der Kopienzahl des Reportergens, der Orientierung der Reportergenkassette und dem Reportergen selber. Effekte auf die Transgenexpression durch regulatorische Elemente wie den Promotor und das 3'-Ende oder durch andere Bereiche der T-DNA sollten sich daher auf alle Konstrukte in gleicher Weise auswirken.

Die Bezeichnungen „f“ und „r“ im Konstruktnamen geben die relative Orientierung der Reportergenkassette zum NPT-Gen an (Abb. 1).

In *A. thaliana* wurde mit allen aufgeführten Konstrukten gearbeitet, *N. tabacum* wurde nur mit den Konstrukten Gus 2xf und Gus 3xr transformiert.

3.2 Verwendete transgene *A. thaliana* Linien und Untersuchungen zu Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen

3.2.1 Verwendete transgene *A. thaliana* Linien

In dieser Arbeit sollte unter anderem der Einfluss der Kopienzahl eines Reportergens auf seine Expression untersucht werden. Daher war es von großer Bedeutung, dass nur Linien verwendet wurden, die eine Kopie der T-DNA aufwiesen. Dann war die Kopienzahl des Transgens durch die Kopienzahl auf der T-DNA und dadurch bestimmt, ob die T-DNA hemi- oder homozygot vorlag. Um Transformanten zu finden, die eine Integration des Transgens an einem Locus trugen, wurde eine genetische Analyse der Nachkommenschaft durchgeführt. Hierzu wurden Samen der T1-Transformanten auf Kanamycin-haltiges Medium ausgelegt und das Verhältnis von resistenten zu sensitiven Pflanzen bestimmt. Das chimäre Neomycinphosphotransferasegen vermittelt Kanamycin-Resistenz. Dabei handelt es sich um ein dominantes Merkmal. Wenn das Verhältnis von resistenten zu sensitiven Nachkommen nicht größer als 3:1 war, hatten die Transformanten mit hoher Wahrscheinlichkeit Transgeninsertionen an nur einem Locus. Bei diesen Segregationsanalysen zeigten eine Reihe von Transformanten und deren Nachkommen ein Verhältnis von Kanamycin-resistenten zu -sensitiven Pflanzen, das teilweise erheblich kleiner war als 3:1. Ursache für diese aberranten Segregationen könnten epigenetische Effekte sein, die zu einer Abschaltung des NPT-Gens in einem Teil der transgenen Pflanzen führten. Daher wurde dieses Phänomen genauer untersucht (3.2.2).

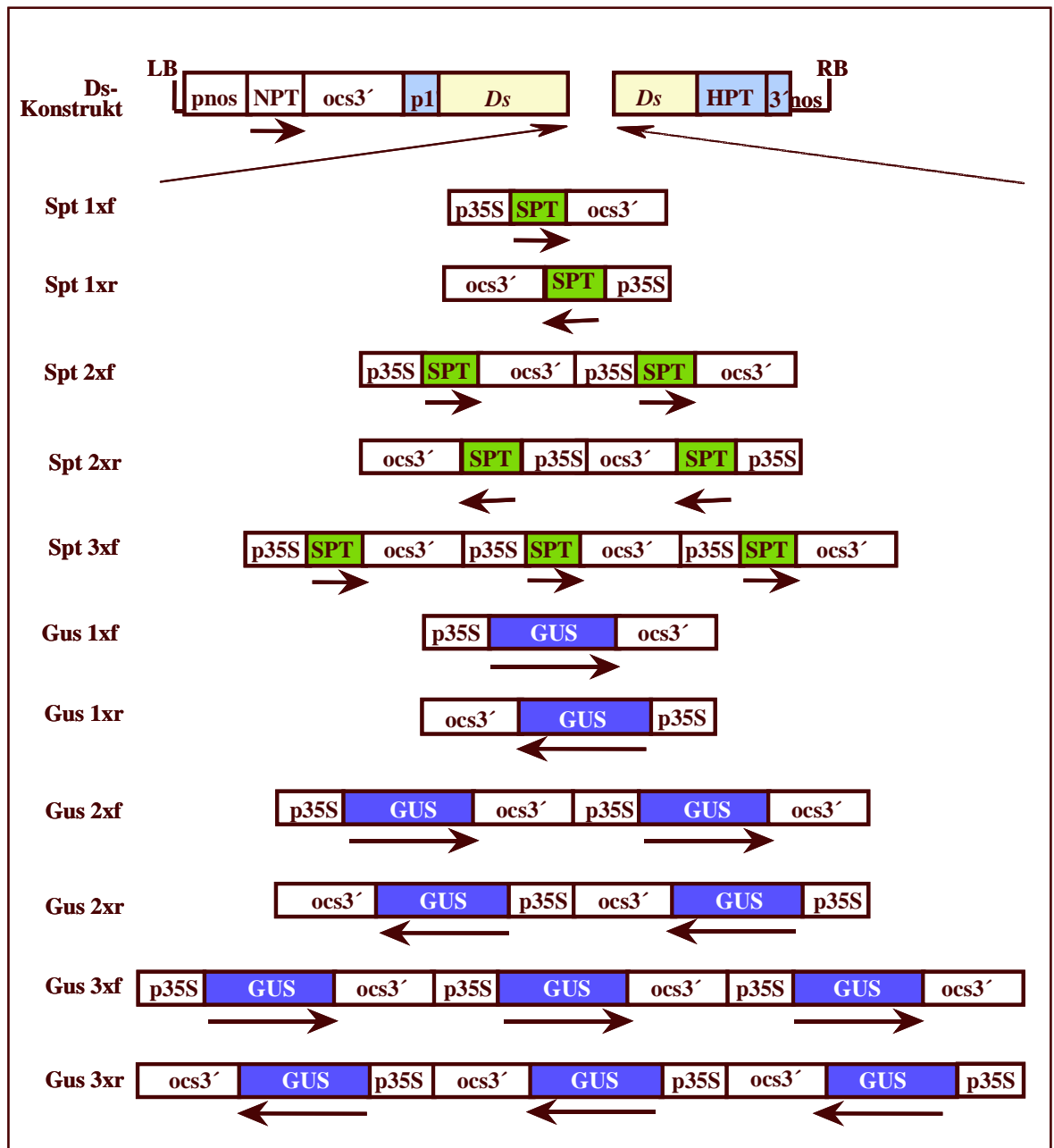


Abbildung 1: Verwendete T-DNA-Konstrukte zur Transformation von *A. thaliana* (alle Konstrukte) und *N. tabacum* (Gus 2xf, Gus 3xr). Alle Reporterengenkassetten waren Teil des Ds-Konstruktes, das die Left und Right Border (LB und RB), den Transformationsmarker (Neomycinphosphotransferase (NPT) unter der Kontrolle des pnos-Promotors mit ocs3'-Polyadenylierungssignal), die Ds-Sequenzen und den Exzisionsmarker Hygromycinphosphotransferase (HPT mit 3'nos Polyadenylierungssignal) enthält. Exzision der Ds-Cassette führt zur Aktivierung des HPT-Gens durch Expression unter dem p1'-Promotor. Als Reportergene wurden die β-Glucuronidase (GUS) oder Streptomycinphosphotransferase (SPT) unter Kontrolle des 35S-Promotors (p35S) mit dem ocs3'-Polyadenylierungssignal verwendet. Die Reporterengenkassetten liegen in ein bis drei Kopien vor. Die Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile markiert.

Die Linien, die T-DNA-Integrationen an nur einem Locus trugen, wurden mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse untersucht, um unter ihnen Linien zu identifizieren, die nur eine intakte Kopie der T-DNA trugen. Die Analyse ist detailliert an anderer Stelle von Gils (2000) und Schubert (1999) beschrieben. Auf diese Weise konnten auch transgene Pflan-

zen gefunden werden, die zwei T-DNAs als invertierte Sequenzwiederholungen an einem Locus aufwiesen (3.3.5).

Die meisten Linien lagen zu Beginn der Arbeit vor (Gils 2000, Schubert 1999) und der genomische Integrationsort der T-DNA war bestimmt (Gils 2000, Forsbach 2001, Schubert 1999). Teilweise wurden transgene Pflanzen mit einer Kopie der T-DNA oder invertierten Sequenzwiederholungen der T-DNAs noch identifiziert und die flankierenden genomischen Sequenzen ermittelt und kartiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Linien mit einer Kopie der T-DNA und die Linien Spt 1xr 88 und Spt 3xf 159, die eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs aufwiesen, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zusätzlich zum Konstruktnamen und der Liniennummer ist der Integrationsort der T-DNA im *A. thaliana* Genom angegeben, falls dieser bestimmt werden konnte.

Tabelle 1: Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

Konstrukt	Linie	Integrationsort im <i>A. thaliana</i> Genom (Akzessionsnr. des BAC)	Position im BAC LB/RB (bp)^A	<i>A. thaliana</i> Chromosom
Gus 1xf	30	AL161555	165846/165874	IV
	60	AP000370	14237/14335	III
	110	AC006340	58407/58418	II
	117	AB013392	30526/n.b.	V
Gus 1xr	3	Nicht kartiert		
	18	AC079284	69279/69294	I
	30	AC004122	17350/17381	I
	69	AC005309	78348/78361	II
	112	AC005662	50703/n.b.	II
	118	AC027134	92304/n.b.	I
	127	AC003671	11953/n.b.	I
	Gus 2xf	23	AC007196	24094/24032
	101	AC016829	22032/22019	III
	108	Nicht kartiert		
	109	AC005398	26068/26101	II
	110	AB026645	1140/1151	III
	113 ^E	AC007169	3328/3348	II
	117	Nicht kartiert		
	119	AL161541	n.b./122738	IV
	151 ^B	AC018363	n.b./28131	III
	158	AC079829	n.b./68020	I
	160	Nicht kartiert		
Gus 2xr	103	AC013354	72562/72544	I
	123	AF262041	13290/13291	V
	125	AC015986	10027/10013	I
	126	AC007918	38121/38146	I
Gus 3xf	101	Nicht kartiert		
	106	AC006418	n.b./38878	II
	112	AL137189	82489/82539	V
	113 ^B	AC058785	46995/n.b.	I
	118	AC007019	58199/58183	II
	122	AB006707	66890/66944	V
Gus 3xr	100	AL162507	n.b./35232	III
	105	AC004133	90642/90626	I
	117 ^C	AL161512	124565/-	IV

		AC016662	-/31161	I
	126	AC005851	n.b./63118	
	130 ^E	AB010069	22249/22219	V
	133	AB025634	23840/n.b.	III
	136 ^E	AC006929	59575/n.b.	II
Spt 1xf	5	Nicht kartiert		
	88 ^D	AB026651	64775/64812 LB2	V
	114	Nicht kartiert		
	124	AC007980	n.b./73315	I
	130	AC023279	n.b./5256	I
	133 ^C	AC007048	27065/-	II
		AL161594	-/187935	IV
Spt 1xr	76	Nicht kartiert		
	92	AC007135	n.b./26026	II
	107	AC000375	85155/85148	I
Spt 2xf	104	AC023628	87382/87384	I
	105	AC008263	n.b./79409	I
	107	AB016871	41526/41477	V
	121 ^E	AB011483	n.b./10397	V
	129	AL132968	28990/29019	III
	132	Nicht kartiert		
	133	AB005237	67109/n.b.	V
Spt 2xr	100	Nicht kartiert		
	101	Nicht kartiert		
	103	AC007190	36791/n.b.	I
Spt 3xf	103	AC067971	67270/67363	I
	108	AL391222	67455/67426	V
	110 ^E	AL138656	37281/n.b.	III
	118	Nicht kartiert		
	139	AC004482	52055/52052	II
	147	AL161565	125697/125681	IV
	154	AL590346	81912/81943	V
	159 ^{D^E}	AB005241	15160/15151LB2	V

Tabelle 1: In dieser Arbeit für Expressionsanalysen verwendete Linien, die eine Kopie der jeweiligen T-DNA tragen (bis auf D). Es sind die Konstruktbezeichnungen, die Liniennummern und der Integrationsort im *A. thaliana* Genom angegeben (*Arabidopsis*-Chromosom, Akzessionsnummer des BACs und Integrations-Position im BAC) A: Es ist die Position der flankierenden genomischen Bereiche der LB und der RB (bei D LB1 und LB2) im BAC aufgeführt, n.b. nicht bestimmt, B: Linie besitzt eine zusätzliche LB, C: Linien tragen ein Chromosomenrearrangement (Daten nicht gezeigt), D: Linien tragen zwei T-DNAs in invertierter Orientierung zueinander an einem Locus, E: Linien weisen eine aberrante Segregation auf Kanamycin-haltigem Medium auf

3.2.2 Untersuchungen zu Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen

Um die Analyse der Linien, die eine Segregation von Kanamycin-resistenten zu -sensitiven Pflanzen, die geringer als 3:1 war (aberrante Segregation), aufwiesen, umfassender gestalten zu können, wurden auch Linien, die andere Konstrukte außer den für die Expressionsanalyse verwendeten (Abb. 1) enthielten, untersucht. Diese Konstrukte bestehen aus dem *Ds*-Konstrukt (Abb. 1) und verschiedenen Reporter genen in unterschiedlichen Kopienzahlen. Da letztere nicht von Bedeutung für die Analyse sind, wird an dieser Stelle nicht näher auf sie eingegangen (siehe aber Lechtenberg 1999, Gils 2000, Forsbach 2001). Für die Linien, die die in der Expressionsanalyse untersuchten Konstrukte enthiel-

ten, wurden alle unabhängigen Transformanten auf eine aberrante Segregation untersucht. Insgesamt waren dies 426 transgene Linien; 9 davon wiesen eine aberrante Segregation auf (2,1%), wobei zu berücksichtigen ist, dass Linien, für die laut statistischem Test nicht entschieden werden konnte, dass sie eine geringere als 3:1 Segregation aufwiesen, nicht untersucht wurden. In Tabelle 2 sind die untersuchten Linien und repräsentative Segregationsdaten aufgeführt. Für alle Linien wurden zusätzliche Segregationsdaten von weiteren Nachkommen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Mit einem *chi*-Quadratstest wurde bestimmt, ob die ermittelten Segregationsdaten der Linien einer 2:1 - (4 Linien) oder einer 1:1 –Segregation (4 Linien) entsprachen. Einige Linien wiesen einen wesentlich geringeren Anteil Kanamycin-resistenter als –sensitiver Pflanzen auf (<1:1-Segregationen, 11 Linien) (z. B. Spt 3xr 129, 25:314). Bei 3 Linien lagen die Segregationsdaten bei verschiedenen Nachkommen zwischen einer 1:1- und einer 2:1-Segregation (Gus 3xr 136, Spt 3xf 110, GSGfp 1xf 154).

Eine mögliche Erklärung für diese aberranten Segregationen könnten epigenetische Effekte sein, die trotz Anwesenheit des NPT-Gens Kanamycin-Sensitivität verursachen würden. Dass das NPT-Gen *per se* intakt ist, ist dadurch bewiesen, dass Nachkommen mit Kanamycin-Resistenz gefunden werden. Außerdem wurde eine Reihe Kanamycin-sensitiver Pflanzen auf Anwesenheit des NPT-Gens mit Hilfe von PCR und Southern-Blot-Analysen untersucht. Bei keiner dieser Pflanzen konnte ein NPT-Gen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2: Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

	repräsentative Segregationsdaten	Verhältnis Kanamycin-resistente zu –sensitive Pflanzen	Wt x Linie ^A	Linie x Wt ^A	Organisation der T-DNA(s)
Gus 2xf 113	(112:56)	2:1	57:61	79:80	1 intakte T-DNA
Gfp 1xr 119	(198:110)	2:1	n.b.	n.b.	1xLB
GSGfp 1xr 116	(236:149)	2:1	n.b.	n.b.	2xLB
Gus S/As f 146	(149:85)	2:1	26:181	57:81	IS RB an RB ¹
Gus 3xr 136	(136:117)	1:1 - 2:1	38:135	64:108	1 intakte T-DNA
Spt 3xf 110	(60:47)	1:1 - 2:1	55:68	70:130	1 intakte T-DNA
GSGfp 1xf 154	(108:72)	1:1 - 2:1	n.b.	n.b.	1 intakte T-DNA
Ds 108	(165:179)	1:1	46:74	19:56	2xRB, 2xLB
Spt 2xf 121	(37:36)	1:1	95:180	36:58	1 intakte T-DNA
Spt 3xf 159	(55:44)	1:1	65:67	32:85	IS RB an RB ¹
Gus S/As f 140	(54:46)	1:1	112:85	64:74	1 intakte T-DNA
Ds 115	(44:321)	<1:1	21:206	0:119	1xLB
Gus 3xr 130	(54:112)	<1:1	52:121	0:96	1 intakte T-DNA
Spt 1xf 109	(89:134)	<1:1	47:184	49:99	3x LB, 2x RB
Spt 3xf 100	(63:105)	<1:1	34:213	52:61	2x RB, 1-2x LB
Spt 3xf 162	(44:151)	<1:1	21:129	63:196	1-2x LB, 2x RB
Spt 3xr 129	(25:314)	<1:1	0:174	12:79	2x RB, 2x LB
Gfp 1xr 112	(40:387)	<1:1	9:166	0:59	1xLB, 1x RB
Gfp 1xr 151	(142:223)	<1:1	27:53	23:66	1xLB, 1x RB
GSG f 119	(147:194)	<1:1	0:83	43:62	2xRB, 3xLB
Gus 1xr 164 149	(114:157)	<1:1	101:187	42:70	1xLB, 1x RB
ΔGus 2a 141	(65:377)	<1:1	0:182	13:68	1xRB, 3x LB

	Position im <i>A. thaliana</i> Genom (Akzessionsnr. des BAC) und im BAC (LB/RB) ^C	Insertion der T-DNA in Gen, mögliche Funktion des Gens und Akzessionsnr. des Gens	Position der T-DNA im Gen
Gus 2xf 113	AC007169 (3328/3348)	At2g31340 ^B	4. Intron
Gfp 1xr 119	AC005313 (36615/n.b.)	At2g03150 Calmodulin ähnliches Protein	15. Intron
GSGfp 1xr 116	AC012193 (35329/n.b.)	kein Gen annotiert	
Gus S/As f 146	AB018116 (6864/6844 LB)	At5g52980 ^B	1. Exon
Gus 3xr 136	AC006929 (59575/n.b.)	At2g28000 Homologie zu Rubisco-Untereinheit bindendem-Protein, α -Untereinheit (<i>schlepperless</i>)	-45 bp ATG ^D
Spt 3xf 110	AL138656 (37281/n.b.)	AF276887 UMP Synthase	1. Intron
GSGfp 1xf 154	AC009853 (86684/n.b.)	At3g07560 ^B	4. Exon
Ds 108	nicht kartiert		
Spt 2xf 121	AB011483 (n.b./10397)	At5g60390 Translations Elongations Faktor eEF-1 alpha Kette (Gen A4)	2. Exon
Spt 3xf 159	AB005241 (15160/15151LB)	At5g05540 ^B	1. Intron
Gus S/As f 140	AC009853 (54033/53941)	At3g07430 ^B	1. Exon
Ds 115	AC011001 (65814/n.b.)	At1g06730 Homologie zu Zucker Kinase	3. Exon
Gus 3xr 130	AB010069 (22249/22219)	At5g61770 <i>Peter Pan</i> -ähnliches Protein	5. Exon
Spt 1xf 109	AC007508 (39403/n.b.)	At1g28760 ^B	4. Intron
Spt 3xf 100	AC023064 (35652/n.b.)	kein Gen annotiert	
Spt 3xf 162	U93215 (50710/n.b.)	At2g30490 Cinnamat-4-Hydroxylase	-65 bp ATG ^D
Spt 3xr 129	AC006068 (25853/25847)	At2g35630 Homolog des ch-TOG Proteins aus <i>Homo sapiens</i> (<i>mor1/gemini pollen1</i>)	12. Exon
Gfp 1xr 112	AB010076 (75116/n.b.)	Ac-ähnliche Transposase	
Gfp 1xr 151	AC021640 (n.b./101159)	kein Gen annotiert	
GSG f 119	AF149413 (47918/n.b.)	At5g26030 Ferrochelatase I	7. Exon
Gus 1xr 164 149	AB013392 (n.b./59234)	kein Gen annotiert	
AGus 2a 141	AC005679 (13578/n.b.)	At1g78900 vacuoläre H ⁺ -ATPase Untereinheit A	19. Exon

Tabelle 2: Transgene *Arabidopsis* Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA(s) aufwiesen. A: reziproke Kreuzungen mit *A. thaliana* Wildtyp; es ist das Verhältnis Kanamycin-resistenter zu -sensitiver Pflanzen angegeben; fettgedruckt sind Segregationsdaten, die eine paternal oder maternal letale Mutation nahe legen, B: Für annotierte Gene, zu denen keine Homologe bekannt sind, ist nur die Akzessionsnummer aufgeführt, C: Die Zahlen geben die Position der flankierenden Sequenz im BAC zur RB bzw. LB (oder in Linien mit einer invertierten Sequenzwiederholung zweier T-DNAs zu beiden LBs) an, D: 5'-Abstand der T-DNA-Integration vom vorhergesagten Translationsstart, IS: invertierte Sequenzwiederholung, n.b. nicht bestimmt.

Eine weitere Erklärung könnten Embryo- oder gametophytisch letale Mutationen sein, die durch die Integration der T-DNA in einem Gen verursacht sein könnten. In diesem Fall sollten aborte Samen in diesen Linien nachzuweisen sein. Daher wurden Schoten dieser transgenen Pflanzen geöffnet und der Phänotyp der Samen bestimmt. Bei allen untersuchten Linien waren nicht vollständig mit Samen gefüllte Schoten nachzuweisen (z. B. bei den Linien Spt 3xr 129 und Ds 115, Abb. 2). An diesen Stellen waren aborte Samen zu erkennen (Abb. 2, mit Pfeilen markiert). Eine genauere phänotypische Analyse sollte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Bei Linien, bei denen eine 2:1 Segregation Kanamycin-resistenter zu -sensitiver Pflanzen beobachtet wurde, konnte postuliert werden, dass die Mutation in einem Gen nur zu nicht lebensfähigen Embryos führt, wenn diese homozygot vorliegt (Embryo-letale Mutation). Bei den Linien, die eine geringere als 2:1 Segregation aufwiesen, sollte bereits das Fehlen des Genproduktes im weiblichen oder männlichen Gametophyten zu nicht lebensfähigen Embryos führen (gametophytisch letale Mutation).

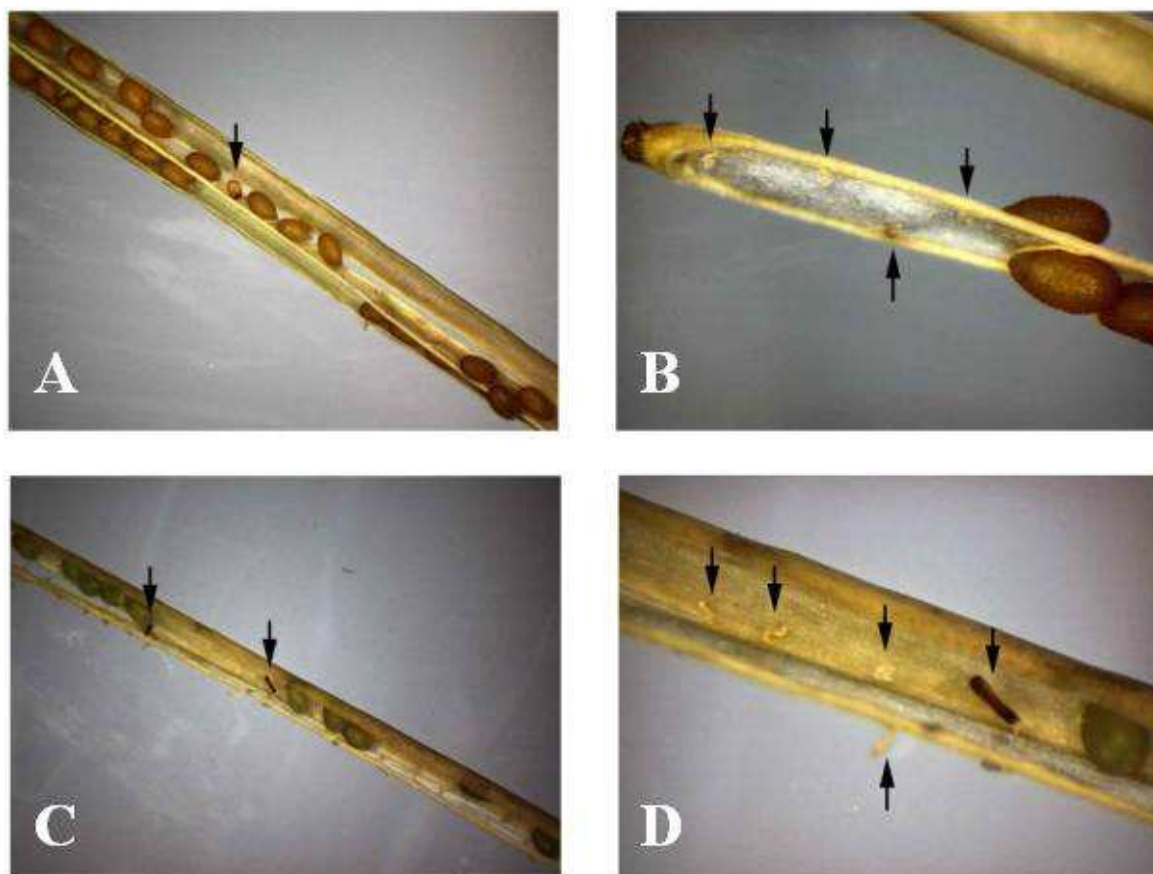


Abbildung 2: geöffnete Schoten **A), B)** der Linie Ds 115 und **C), D)** der Linie Spt 3xr 129, abortive Samen sind mit Pfeilen markiert.

Um herauszufinden, ob der weibliche, der männliche oder beide Gametophyten von der Mutation betroffen waren, wurden reziproke Kreuzungen der meisten Linien mit *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen durchgeführt. Da für die T-DNA hemizygoten Pflanzen gekreuzt wurden, bedeutet eine 1:1 Segregation an Kanamycin-resistenten zu –sensitiven Nachkommen keine Beeinflussung des Gametophyten. Dies wurde z. B. bei der Linie Gus 2xf 113 beobachtet (Tab. 2). Beide reziproke Kreuzungen ergaben eine 1:1 Segregation. In dieser Linie liegt eine Embryo-letale Mutation vor (2:1 Segregation der durch Selbstung erhaltenen Nachkommen). In der Linie Spt 3xf 159 beispielsweise liegt eine Beeinflussung des weiblichen, aber nicht des männlichen Gametophyten vor (Nachkommen der Kreuzung mit Wildtyp als Pollen-Donor zeigten eine Segregation geringer als 1:1, Nachkommen der reziproken Kreuzung wiesen eine 1:1 Segregation auf). Bei der Linie Spt 3xf 100 führt die Mutation dagegen nur zu einer verringerten Transmission der T-DNA durch den männlichen Gametophyten. Bei den meisten Linien waren allerdings beide Gametophyten in unterschiedlichem Ausmaß von der Mutation betroffen. Bei 3 Linien führte die Mutation in allen Nachkommen zur Letalität des männlichen Gametophyten (Spt 3xr 129, GSG f 119 und Δ GUS2a 141), bei drei weiteren Linien wurde keine Transmission der T-DNA durch den weiblichen Gametophyten gefunden (Ds 115, Gus 3xr 130, Gfp 1xr 112). Bei der Linie Gus S/As f 140 wurde erstaunlicherweise keine Beeinflussung einer der beiden Game-

tophyten trotz einer 1:1 Segregation der Nachkommen aus der Selbstung der Linie gefunden. Die Linie Gus S/As f 146 zeigte dagegen eine verringerte Transmission der T-DNA durch beide Gametophyten, obwohl die Segregationsanalyse der durch Selbstung erhaltenen Nachkommen eine Embryo-letale Mutation vermuten ließ. Zusätzlich wurden unabhängige Kreuzungen für einen Teil der Linien mit *A. thaliana* Wildtyp durchgeführt, die die erhaltenen Ergebnisse bestätigen konnten (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, ob die beobachteten Embryo- oder gametophytisch letalen Phänotypen durch Insertion einer T-DNA in einem Gen verursacht sind, wurden die flankierenden genomischen Sequenzen der T-DNA mit Hilfe von inverser PCR bestimmt. Bei fast allen Linien konnten die flankierenden Sequenzen ermittelt werden. Mit einer Datenbankanalyse wurde nach dem Integrationsort der T-DNA im *A. thaliana* Genom gesucht (Altschul *et al.* 1990). Die Mehrzahl der Insertionen wurden im möglichen Promotorbereich und in Exons und Introns von Genen gefunden. Für 2 Linien konnte eine Insertion im Promotor des Gens bzw. in einem Gen ermittelt werden, von dem bekannt war, dass eine Mutation in dem Gen zu einem Embryo- bzw. gametophytisch letalen Phänotypen führte (Gus 3xr 136: *schlepperless* (Apuya *et al.* 2001); Spt 3xr 129: *geminipollen1* (D. Twell, pers. Kommunikation)). Die T-DNA der Linie Gus 3xr 130 war in einem *peter-pan*-ähnlichen Gen inseriert (Migeon *et al.* 1999). Eine Mutation im *peter-pan*-Gen in *D. melanogaster* führt dort zu einem Defekt im Larvalwachstum. Bei 5 Linien lag die T-DNA-Insertion in Genen, deren Genprodukt in *A. thaliana* bereits genauer charakterisiert worden waren, von denen allerdings keine Mutationen bekannt waren (Spt 2xf 121: α -Kette des Translationselongationsfaktors eEF-1 (Axelos *et al.* 1989), Spt 3xf 110: UMP Synthase (Nasr *et al.* 1994), Spt 3xf 162: Cinnamat-4-Hydroxylase (Bell-Lelong *et al.* 1997) (Insertion im Promotor), GSG f 119: Ferrochelatase I (Chow *et al.* 1998), Δ GUS2a 141: vakuoläre H⁺-ATPase Untereinheit A (Aviezer-Hagai *et al.* 2000)). Bei diesen Genen bzw. Proteinen konnte eine grundlegende Bedeutung im Zellstoffwechsel nahegelegt werden. Bei zwei weiteren Linien wurden T-DNA-Insertionen in homologen Genen von bekannten Proteinen ermittelt (Ds 115, Homologie zu einer Zucker Kinase; Gfp 1xr 119 Homologie zu einem Calmodulin). Die flankierenden Sequenzen von 5 T-DNAs zeigten Homologie zu Genen von nicht charakterisierten Proteinen (Gus 2xf 113, Spt 1xf 109, Spt 3xf 159, Gus S/As f 140, Gus S/As f 146). Bei 4 Linien konnte keine Insertion in einem Gen oder im Promotorbereich identifiziert werden (Spt 3xf 100, Gfp 1xr 151, GSGfp 1xr 116, Gus 1xr 164 149) (Tab. 2).

Grundsätzlich ist zu berücksichtigen, dass nicht bestimmt wurde, ob die ermittelte Insertion für den Phänotypen verantwortlich ist. Hierzu müsste z.B. eine Komplementationsanalyse erfolgen. Für einige Linien wurde mehr als eine T-DNA-Insertion mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen nachgewiesen, so dass möglicherweise eine T-DNA-Insertion an

einer anderen Stelle im *A. thaliana* Genom für den Phänotypen verantwortlich sein könnte (Tab. 2).

Die Analyse der Linien, die eine aberrante Segregation der T-DNA aufwiesen, zeigte also, dass diese Phänomene nicht durch epigenetische, sondern durch genetische (aber nicht den Mendel'schen Gesetzen folgenden) Ursachen erklärt werden können.

3.3 Expressionsanalyse der SPT- und GUS-Reportergene in *A. thaliana*

In den folgenden Abschnitten werden die Experimente dargestellt, die ausgeführt wurden, um den Einfluss der Genomposition und invertierter Sequenzwiederholungen auf die Expression von SPT-Reportergenen und den Einfluss der Kopienzahl von SPT- und GUS-Reportergenen auf ihre Expression zu bestimmen.

3.3.1 Stabile und uniform hohe Expression des SPT-Gens in unabhängigen transgenen Pflanzen

Die Konstrukte mit dem Reportergen Streptomycinphosphotransferase unter dem 35S Promotor enthielten ein, zwei oder drei Kopien des SPT-Gens auf einer T-DNA (Abb.1). Die Reportergene lagen für die Konstrukte mit einer oder zwei Kopien des SPT-Gens in beiden verschiedenen Orientierungen zum NPT-Gen vor. Das Konstrukt mit drei Kopien des SPT-Gens trug die Reportergene nur in derselben Orientierung wie das NPT-Gen (Abb. 1).

Durch umfangreiche Analysen konnten für das SPT 1xf-Konstrukt 5, für das SPT 1xr-Konstrukt 3 (Gils 2000, diese Arbeit), für das SPT 2xf-Konstrukt 7 (diese Arbeit), für das SPT 2xr-Konstrukt 3 (Gils 2000) und für das SPT 3xf-Konstrukt 7 (diese Arbeit) Linien identifiziert werden, die lediglich eine intakte Kopie der jeweiligen T-DNA trugen (Tab. 1).

Um zu zeigen, dass die T-DNAs der verschiedenen Linien an unterschiedlichen Stellen im *A. thaliana* Genom integriert waren und keine Präferenz für bestimmte Bereiche vorlag, wurden die flankierenden Sequenzen der T-DNAs mit Hilfe von inverser PCR für die meisten Linien bestimmt. Für die 18 Linien mit einer T-DNA, deren Position bestimmt worden war, zeigte sich eine Verteilung auf alle 5 *A. thaliana* Chromosomen (Tab. 1, Abb. 3). In der Linie SPT 1xf 133 lag eine Chromosomenumordnung vor, so dass für die LB und die RB zwei verschiedene Integrationsstellen ermittelt wurden (Daten nicht gezeigt). Daher sind zwei Positionen eingetragen. Zusätzlich sind die Integrationsorte der Linien eingetragen, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung zueinander tragen (SPT 1xr 88, SPT 3xf 159) (3.3.5).

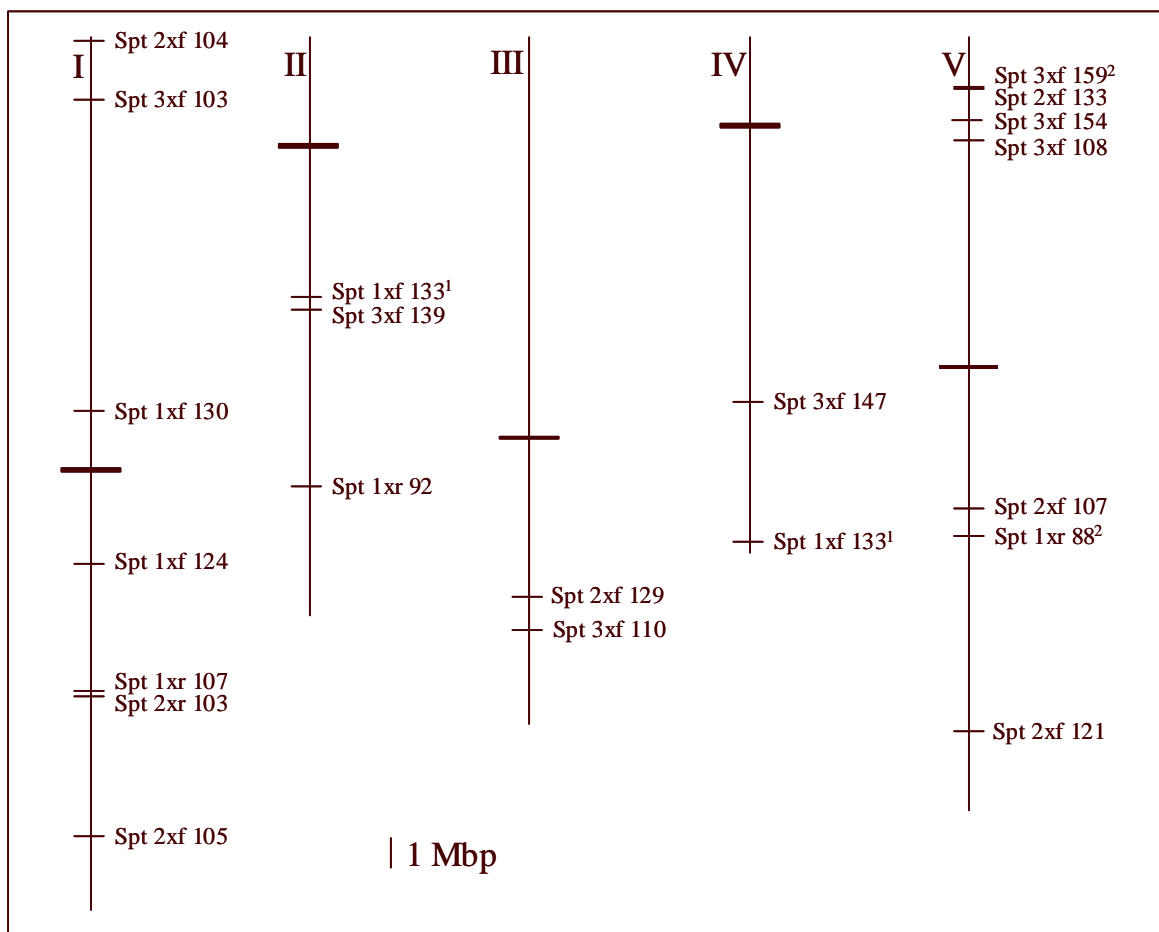


Abbildung 3: Position der T-DNAs von Linien, die 1 bis 3 SPT-Gene enthalten, in einer Sequenzkarte der 5 *Arabidopsis* Chromosomen. Die Größe der Chromosomen ist in Megabasenpaaren (Mbp) angegeben. Die Centromere der Chromosomen sind fettgedruckt. 1 Linie besitzt eine Chromosomenumordnung, 2 Linien weisen eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs auf.

Der qualitative Nachweis der Expression der SPT-Gene wurde durch Auslegen von Samen der SPT-Linien auf Streptomycin-haltigem Medium (200 mg/l) erbracht. Alle Linien zeigten ein normales Wachstum, wohingegen Wildtyp-Pflanzen ausgebleichene Kotyledonen aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Zur Quantifizierung der Expression der SPT-Gene wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Rosettenblätter (etwa 60 mg) von 8 Wochen alten Pflanzen geerntet, und Gesamt-RNA präpariert. Die RNA wurde auf Formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer Sonde, die spezifisch für die codierende Sequenz des SPT-Gens ist. Zur Standardisierung der geladenen RNA wurde die Membran mit einer Actin-2/8-Sonde hybridisiert. Die Actin-Sonde wurde gewählt, weil die Actin-Gene 2 und 8 in den meisten Geweben gleichmäßig exprimiert sind (An *et al.* 1996).

Die RNA wurde nur von Linien isoliert, die die T-DNA homozygot trugen. Dies bedeutet, dass in transgenen Pflanzen, die das SPT 1xf- oder SPT 1xr-Konstrukt trugen, 2 Kopien

des SPT-Reportergens vorlagen. Dementsprechend trugen Pflanzen mit dem SPT 2xf- oder SPT 2xr-Konstrukt 4 Kopien und mit dem SPT 3xf-Konstrukt 6 Kopien des SPT-Gens.

Für die 8 Linien, die das SPT 1xf- oder das SPT 1xr-Konstrukt enthielten, zeigten die Northern-Blot-Experimente eine hohe und einheitliche Expression der SPT-Gene. Die Standardisierung mit der Actin-Sonde ließ sehr ähnliche Beladung erkennen (Abb. 4a). Die Quantifizierung erfolgte mit einem Phosphoimager. Es wurde die relative Schwärzung der Hybridisierung mit der SPT-Sonde und mit der Actin-Sonde bei den einzelnen Linien ermittelt. Der Quotient aus den ermittelten Werten für SPT und Actin zeigte Unterschiede von maximal einem Faktor 2,6 (Linie SPT 1xr 92 etwa 10 relative Einheiten zu 3,8 relative Einheiten bei der Linie SPT 1xf 133) (Abb. 4b).

Die Expressionsanalyse für die Linien mit zwei bzw. drei Kopien des SPT-Reportergens auf einer T-DNA bestätigte diese Ergebnisse, denn die Expression der SPT-Gene unterschied sich in unabhängigen Transformanten mit der gleichen Kopienzahl des Reportergens nur geringfügig (Daten nicht gezeigt).

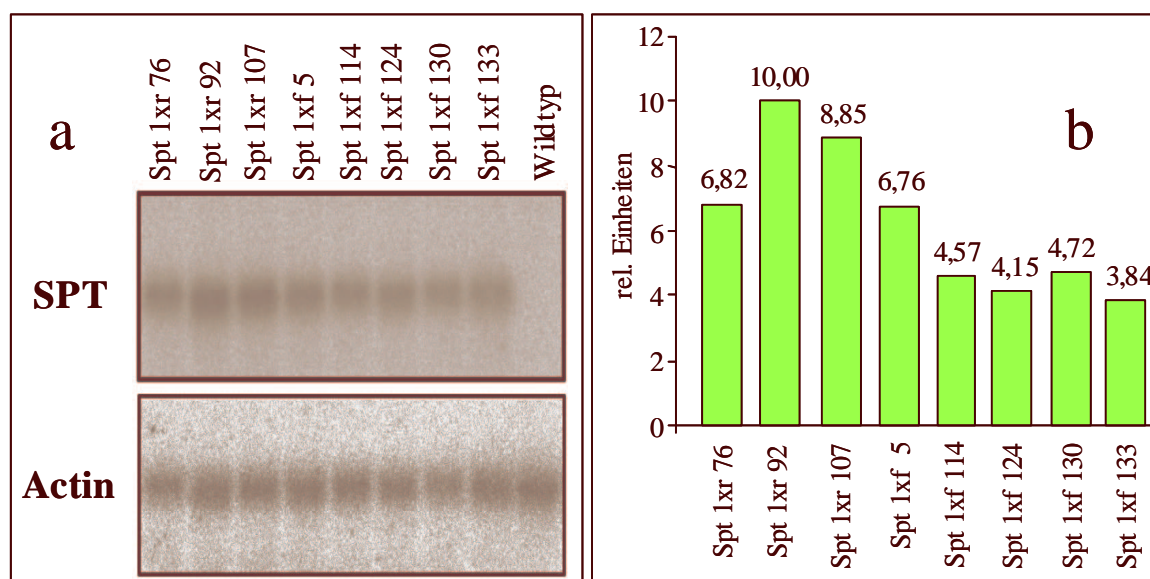


Abbildung 4: Northern-Blot-Analyse von für die T-DNA homozygoten Spt 1xr und Spt 1xf Linien. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und auf einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen. **a)** Hybridisierung der Membran mit der SPT-Sonde. Nach Entfernen der Sonde wurde die Membran mit einer Actin-Sonde zur Standardisierung der Ladung der RNA hybridisiert. **b)** Quantitative Auswertung der Northern-Blot-Analyse. Es wurde der Quotient aus der relativen Schwärzung der Hybridisierung mit der SPT-Sonde und der relativen Schwärzung der Hybridisierung mit der Actin-Sonde gebildet. Die ermittelten Werte sind über den Balken angegeben.

Für insgesamt 25 unabhängige transgene Linien mit dem SPT-Reportergen konnte eine stabile, hohe Expression der SPT-Gene gezeigt werden. Da die Position der meisten T-DNAs im *A. thaliana* Genom bestimmt und eine Verteilung über alle 5 Chromosomen

gefunden wurde, kann nahegelegt werden, dass der Einfluss der flankierenden Bereiche eine untergeordnete Rolle auf die Expression eines Transgens unter der Kontrolle eines starken Promotors hat.

3.3.2 Alle Kopien eines SPT-Gens tragen zu gleichen Teilen zur Expression bei

Um festzustellen, ob eine erhöhte Kopienzahl der Reportergene zu einer Erhöhung der Expression der SPT-Gene führt, wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt, bei denen Gesamt-RNA aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen mit zwei, 4 und 6 Kopien des SPT-Gens aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit einer SPT- und einer Actin-Sonde hybridisiert wurden. Es bestand eine positive Korrelation zwischen Kopienzahl und Expression der SPT-Gene (Abb. 5). Linien mit 6 Kopien des SPT-Gens (SPT 3xf 108 und SPT 3xf 147) zeigten eine etwa dreifache, Linien mit 4 Kopien des SPT-Gens (SPT 2xf 107 und SPT 2xr 101) eine etwa doppelt so starke Hybridisierung wie Linien mit 2 Kopien (SPT 1xf 124 und SPT 1xr 107). Die Actin-Hybridisierung zeigte leicht stärkere Beladung bei den Linien SPT 1xr 107, SPT 2xr 101 und SPT 3xf 108, was die etwas stärkeren Signale mit der SPT-Sonde verglichen mit denen der Linien SPT 1xf 124, SPT 2xf 107 und SPT 3xf 147 erklärt. Obwohl Unterschiede von maximal einem Faktor 2,6 in der SPT-Expression bei Linien mit 2 Kopien gefunden wurden (3.3.1), überwog der Einfluss der Kopienzahl auf die Expression im Vergleich zur Variabilität der Expression zwischen Linien mit gleicher Kopienzahl, wenn die Expressionswerte aller Linien berücksichtigt wurde. Dies zeigten Northern-Blot-Analysen von allen Linien (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 5 ist daher repräsentativ.

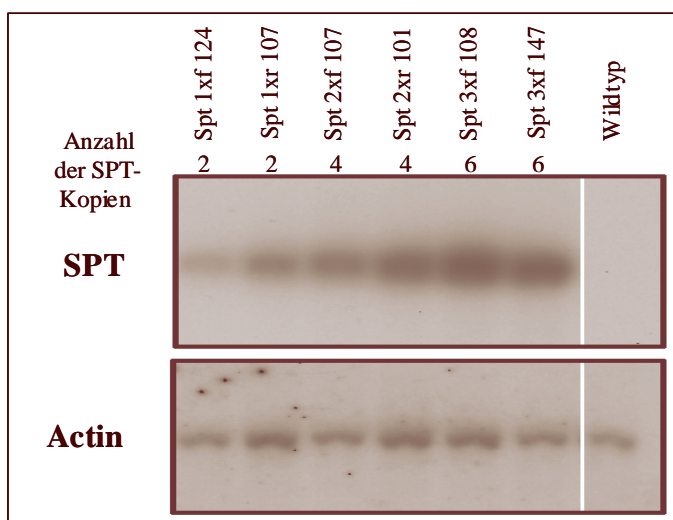


Abbildung 5: Northern-Blot-Analyse von für die T-DNA homozygoten Spt 1xf, Spt 1xr, Spt 2xf, Spt 2xr und Spt 3xf Linien. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und auf einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Membran wurde mit einer SPT-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer Actin-Sonde zur Standardisierung der Ladung der RNA hybridisiert. Die Anzahl der SPT-Kopien in den verschiedenen Linien ist angegeben.

3.3.3 Gen-Silencing des SPT-Gens bei erhöhter SPT-Kopienzahl

Um festzustellen, ob eine weitere Erhöhung der Kopienzahl des SPT-Gens zu einer weiteren koordinierten Anhebung der Expression führte, wurden jeweils zwei unabhängige Linien, die das SPT 3xf-Konstrukt trugen, gekreuzt. Die F₂-Generation wurde durch PCRs und Southern-Blots analysiert, um für beide T-DNAs homozygote Pflanzen zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). Diese Linien enthielten daher 12 Kopien des SPT-Gens. Es wurden die Linie SPT 3xf 103 mit der Linie SPT 3xf 147, die Linie SPT 3xf 108 mit der Linie SPT 3xf 139 und die Linie SPT 3xf 118 mit der Linie SPT 3xf 147 gekreuzt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden durch Kreuzungen transgene Pflanzen erzeugt, die je eine T-DNA hemizygot der Linien SPT 3xf 103, 108 und 139 aufwiesen, also 9 Kopien des SPT-Gens hatten, und die je eine T-DNA hemizygot der Linien SPT 3xf 103, 108, 139 und 147 trugen, also je drei Kopien an 4 verschiedenen Loci (insgesamt 12 Kopien) enthielten (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der SPT-Gene in Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit Hilfe von Northern-Blots und anschließenden Hybridisierungen mit einer SPT-, einer OCS- und einer Actin-Sonde ermittelt. Als Kontrollen wurden Gesamt-RNAs von Linien mit 2, 4 und 6 Kopien des SPT-Gens aufgetragen. Die lange Exposition des Films ließ die Unterschiede in der SPT-mRNA-Menge in diesen Linien nur schwer erkennen. Bei allen Linien mit 9 oder 12 Kopien des SPT-Gens war eine erhebliche Reduktion der SPT-mRNA zu erkennen (Abb. 6). Zusätzlich erschienen bei diesen Pflanzen mindestens drei verkürzte Transkripte (markiert mit Pfeilen, ca. 600, 700 und 850 b im Gegensatz zu etwa 1100 b des Vollängen-SPT-Transkriptes), wobei das Transkript bei 850 b die stärkste Hybridisierung zeigte, sogar stärker als die des Vollängentranskriptes. Auch bei den Linien SPT 2xr 101, SPT 3xf 108 und SPT 3xf 147 sind möglicherweise verkürzte Transkripte zu erkennen. Die Hybridisierung mit der Actin-Sonde zeigte eine vergleichbare Beladung in den verschiedenen Spuren.

Die Menge an SPT-mRNA bei der Linie mit 9 Kopien und bei den Linien mit 12 Kopien ist vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass eine Restmenge an mRNA unabhängig von der Kopienzahl der inaktivierten SPT-Gene bestehen bleibt. Vermutlich wird auch eine weitere Erhöhung der Kopienzahl keine weitere Verminderung der SPT-mRNA nach sich ziehen.

Die Mengen des Vollängen- und der verkürzten Transkripte bei den Linien, die Silencing aufweisen, zusammengenommen sind deutlich geringer als die Menge des Vollängentranskriptes bei den SPT 3xf Linien. Falls die verkürzten Transkripte ein Abbauprodukt sein sollten, wird demnach nur ein Teil des Vollängentranskriptes zu den verkürzten Transkripten abgebaut. Ein weitaus größerer Teil wird vermutlich zu kleineren RNAs oder vollständig degradiert. Zur weiteren Charakterisierung der verkürzten Transkriptes wurde

die Membran mit einer OCS-Sonde hybridisiert, um zu zeigen, ob Teile des 3'-Endes verkürzt sein könnten (Abb. 6). Die Hybridisierung zeigte ein ähnliches Bild wie mit der SPT-Sonde. Das OCS-3'-Ende ist demnach in den verkürzten Transkripten noch vorhanden. Möglicherweise fehlen in den verkürzten Transkripten also 5'-gelegene Bereiche der SPT-mRNA.

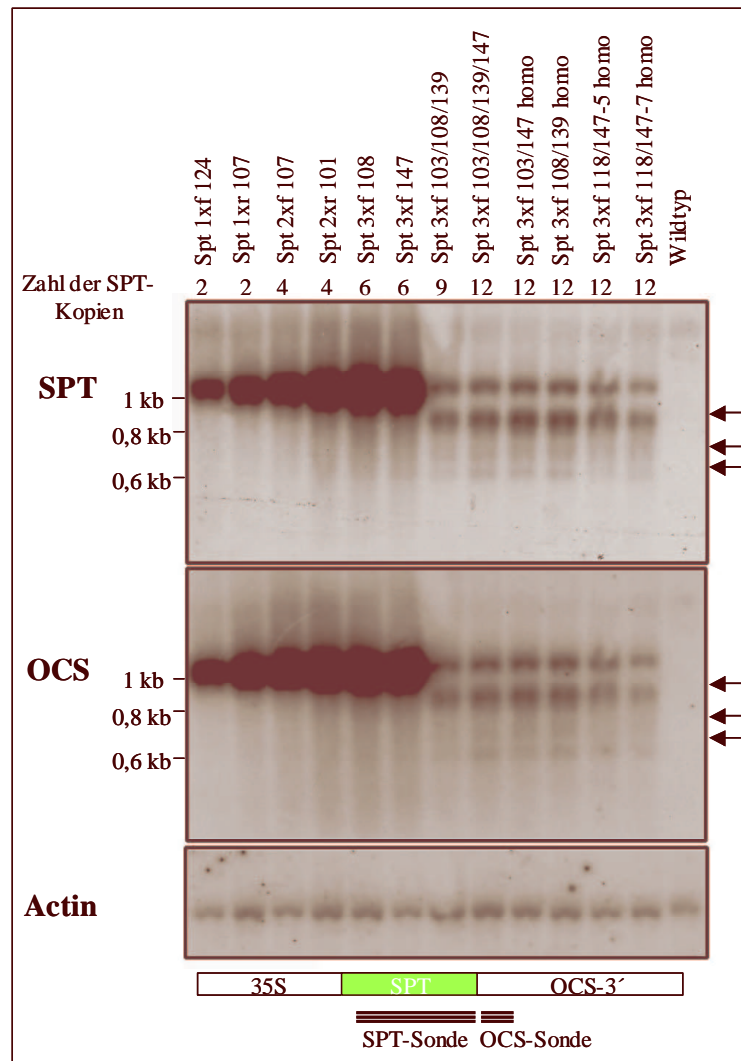


Abbildung 6: Northern-Blot-Analyse von Linien, die 2, 4, 6, 9 oder 12 SPT-Kopien enthielten. Die Anzahl der SPT-Kopien ist unter der Bezeichnung der Linien angegeben. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Membran wurde zuerst mit einer SPT-Sonde, nach Entfernen der Sonde mit einer Actin-Sonde und nach Entfernen dieser mit einer OCS-Sonde hybridisiert. Die verkürzten Transkripte, die in den Hybridisierungen mit der SPT- und der OCS-Sonde detektiert wurden, sind mit Pfeilen markiert.

Das Silencing der SPT-Gene ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Erhöhung der SPT-Transkriptmenge bei erhöhter Kopienzahl zurückzuführen. Liegt eine Kopie der SPT 3xf-T-DNA hemi- oder homozygot vor, also 3 oder 6 Kopien des SPT-Gens, zeigt sich eine sehr hohe Expression. Kombination zweier Loci mit 6 und 3 bzw. 6 und 6 SPT-Kopien

führt zum Silencing. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Silencing der SPT-Gene bereits bei 7 oder 8 GUS-Kopien festgestellt werden kann. Paarung homologer DNA-Sequenzen als Auslöser des Silencings kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da trotz repetitiver Organisation bei 6 Kopien des SPT-Gens kein Silencing festgestellt werden kann. Die Erhöhung der SPT-Transkriptmenge über einen bestimmten Schwellenwert könnte zur Initiation des Silencings führen.

Um festzustellen, ob das Silencing der SPT-Gene zu Streptomycin-Sensitivität der transgenen Linien mit 12 Kopien des SPT-Gens führt, wurden Samen auf Streptomycin-haltiges Medium ausgelegt. Die Pflanzen zeigten ein normales Wachstum ebenso wie Pflanzen mit nicht stillgelegten SPT-Genen (Daten nicht gezeigt). Streptomycin wirkt nur auf Kotyledonen in *A. thaliana* (Dean *et al.* 1992). Die SPT-Proteinmenge reichte in Kotyledonen also aus, um Resistenz zu verleihen.

3.3.4 Das Silencing der SPT-Gene beruht auf einem posttranskriptionellen Mechanismus

Beim Silencing eines Gens können zwei verschiedene Mechanismen unterschieden werden: posttranskriptionelles und transkriptionelles Silencing (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Bei transkriptionellem Silencing (TGS) ist die Transkription eines Gens durch epigenetische Mechanismen verhindert, also kann auch keine mRNA mehr nachgewiesen werden. TGS ist verbunden mit extensiver Promotormethylierung und ist meiotisch nicht reversibel. Es werden keine kleinen, interferierenden RNAs (siRNAs) der codierenden Sequenz des Gens gefunden. Posttranskriptionelles Silencing (PTGS) ist dadurch ausgezeichnet, dass die hohe Transkription eines Gens aufrechterhalten wird, aber nur geringe mRNA-Mengen gefunden werden. Häufig ist Methylierung der codierenden Sequenz zu finden. Bei PTGS sind grundsätzlich siRNAs der codierenden Sequenz nachweisbar (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001).

Da in Pflanzen mit 9 oder 12 SPT-Kopien eine Transkriptrestmenge gefunden wurde, konnte postuliert werden, dass das Silencing auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht. Um weitere Hinweise zu erlangen, wurden eine Methylierungsanalyse und Untersuchungen zum Nachweis von siRNAs der codierenden Sequenz des SPT-Gens durchgeführt. Sind Cytosine in der DNA-Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym methyliert, so können viele Enzyme diese Sequenz nicht schneiden. Man unterscheidet symmetrische und asymmetrische Methylierung. Bei symmetrischer Methylierung schließt sich 3' an das methylierte Cytosin ein Guanin (CG-Methylierung) oder eine beliebige Base und dann ein Guanin an (CNG-Methylierung). Bei asymmetrischer Methylierung befinden sich beliebige Basen außer Guanin im 3'-Bereich des Cytosins.

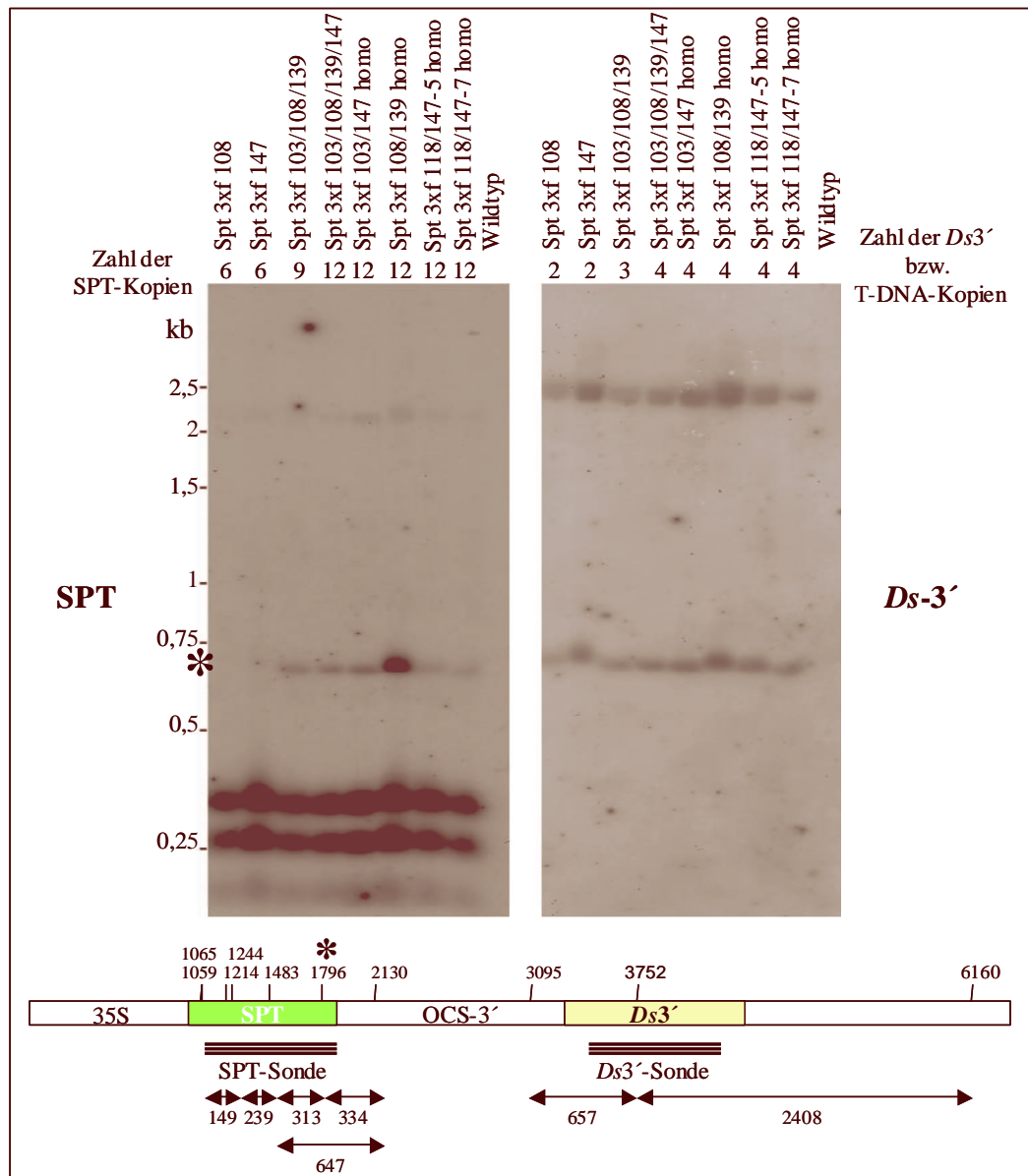


Abbildung 7: Methylierungsanalyse von Linien mit 6, 9 und 12 SPT-Kopien. Genomische DNA von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit *HaeII* gespalten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer SPT-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds3'*-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens der DNA. Die Anzahl der SPT- und der *Ds3'*- bzw. T-DNA-Kopien in den verschiedenen Linien ist angegeben. Zusätzlich ist eine Restriktionskarte mit den erhaltenen Fragmenten aufgeführt. Das Fragment, das durch Methylierung der *HaeII*-Schnittstelle bei 1796 bp erhalten wurde, und die Schnittstelle sind mit einem Stern markiert. Das Fragment bei etwa 2 kb in der SPT-Hybridisierung ist auf eine unspezifische Hybridisierung zurückzuführen.

Es wurden die Methylierungs-sensitiven Enzyme *HaeII* und *HaeIII* für die Analyse des SPT-Gens ausgewählt. *HaeII* erkennt die Sequenz Purin-GCGC-Pyrimidin und kann bei Methylierung des ersten Cytosin nicht schneiden, also nicht bei CG-Methylierung. *HaeIII* andererseits erkennt die Sequenz GGCC und kann bei Methylierung des ersten Cytosins nicht schneiden, also nicht bei CNG- oder asymmetrischer Methylierung. Es wurde DNA aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert und mittels einer Restriktions-

und Southern-Blot-Analyse untersucht. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit einer SPT-Sonde. Da überprüft werden muss, ob das mögliche unvollständige Schneiden tatsächlich auf Methylierung der Schnittstelle beruht, muss eine Kontroll-Hybridisierung mit einer anderen Sonde erfolgen. Hierfür wurde eine *Ds*-3'-Sonde ausgewählt. Es ist nur die Analyse mit *Hae*II gezeigt (Abb. 7). Die Linien, die 9 oder 12 Kopien des SPT-Gens tragen, weisen Methylierung an einer *Hae*II-Schnittstelle, also CG-Methylierung auf, so dass sich ein Fragment von 647 bp ergibt. Linien mit 6 Kopien des SPT-Gens zeigen hingegen keine Methylierung. In der Hybridisierung mit der *Ds*3'-Sonde ist vollständiges Schneiden und vergleichbare Ladung der DNAs zu erkennen.

Eine Methylierung von *Hae*III-Schnittstellen und damit CNG- oder asymmetrischer Methylierung konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl vergleichbare DNA-Mengen wie in der Analyse mit *Hae*II eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden Gesamt-RNAs isoliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die niedermolekularen RNAs wurden auf eine Membran transferiert und diese mit einer SPT-Sonde hybridisiert. Nach Entfernen der SPT-Sonde wurde die Membran mit einer OCS-Sonde hybridisiert. Als Größenstandard und Hybridisierungskontrolle wurden Oligonukleotide aufgetragen, die spezifisch für das SPT-Gen (SPT-Met, 23 Basen) und das OCS-3'-Ende (OCS-F, 21 Basen) sind.

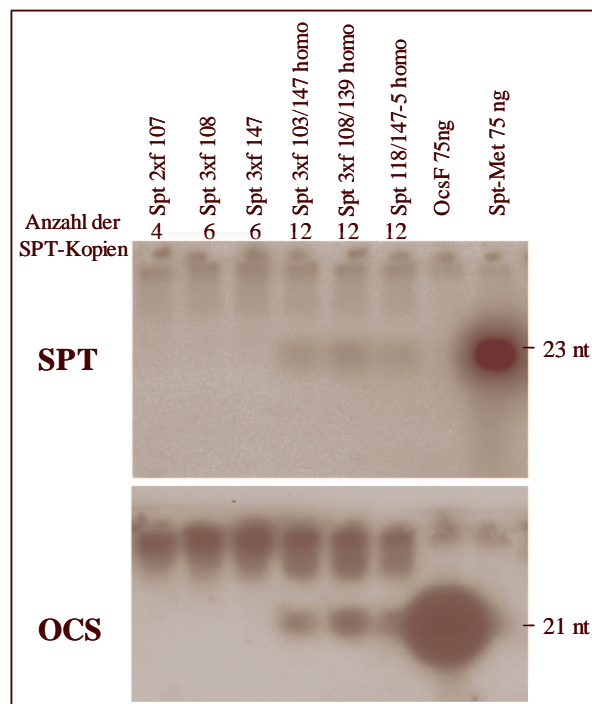


Abbildung 8: Nachweis von siRNAs in Linien, die Silencing der SPT-Gene aufwiesen. Gesamt-RNAs wurden aus 8 Wochen alten Pflanzen isoliert, auf einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer SPT- und nach Entfernen der Sonde mit einer OCS-Sonde hybridisiert. Die Anzahl der SPT-Kopien in den verschiedenen Linien ist angegeben. Als Größenstandard und Hybridisierungskontrolle wurden 75 ng des SPT-Met- und des OcsF-Oligonukleotide, gemischt mit Wildtyp-RNA, aufgetragen. Die höhermolekularen Signale sind auf unspezifische Hybridisierung zurückzuführen.

Für die drei Linien, die 12 Kopien des SPT-Gens tragen, sind deutlich siRNAs in beiden Hybridisierungen zu erkennen (Abb. 8). Bei den Linien, die kein Silencing aufweisen, sind auch keine siRNAs nachzuweisen.

Anhand dieser Experimente konnte eindeutig Silencing der SPT-Gene mit dem Auftreten von Methylierung und siRNAs der codierenden Sequenz des SPT-Gens verknüpft werden. Für das OCS-3'-Ende konnten ebenfalls siRNAs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Silencing der SPT-Gene auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht.

3.3.5 Zwei T-DNAs in invertierter Sequenzwiederholung zueinander, die SPT-Gene tragen, weisen hohe, stabile Expression der Reportergene auf

Neben Kopienzahleffekten werden invertierte Sequenzwiederholungen als mögliche Auslöser von Gen-Silencing beschrieben (zusammengefasst in Selker 1999). Im Rahmen der detaillierten Southern-Blot-Analysen der SPT-Linien, konnten zwei Linien identifiziert werden, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung zueinander trugen (Spt 1xr 88 und Spt 3xf 159) (3.2.1). Die Analyse des T-DNA-Locus erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Apa*I, *Mva*I, *Pvu*II und einer Kombination der Enzyme *Pst*I und *Xho*I bzw. *Eco*RI und *Bg*III. Die gespaltene DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit einer RB-Sonde (alle Enzyme) und einer LB-Sonde (*Pst*I/*Xho*I, *Eco*RI/*Bg*III) hybridisiert. Die Ergebnisse der Hybridisierungen mit der RB-Sonde sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei der Analyse mit den Enzymen *Bam*HI, *Apa*I, *Mva*I und *Pvu*II waren interne T-DNA-Fragmente zu erwarten, die sich in beiden Linien für die Enzyme *Bam*HI und *Apa*I unterscheiden sollten (Tab. 3). Bei beiden Linien wurden die erwarteten Fragmente erhalten. Zusätzlich wurden bei der Linie Spt 3xf 159 Fragmente detektiert, die spezifisch für eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs RB an RB waren (Tab. 3).

Bei der Linie Spt 1xr 88 wurde neben den internen T-DNA-Fragmenten jeweils ein weiteres Fragment in den Analysen mit den verschiedenen Restriktionsenzymen detektiert. Dieses entsprach allerdings nicht den Erwartungen zweier direkt aneinander grenzender T-DNAs RB an RB (bis auf die Analyse mit *Mva*I). Da aber nur jeweils ein Fragment detektiert wurde, war davon auszugehen, dass ein Stück uncharakterisierte DNA an den RBs der beiden T-DNAs lag, das aber vermutlich auch als invertierte Sequenzwiederholung vorlag. Da mit den Enzymen *Apa*I und *Bam*HI jeweils ein Fragment, das größer als 10 kb war, nachgewiesen wurde, ist dieses Stück DNA vermutlich größer als 10 kb.

In der Hybridisierung mit der LB-Sonde waren für beide Linien je zwei Fragmente zu erkennen, die eine Kombination aus LB-Sequenz und genomischer *A. thaliana* Sequenz darstellen (Daten nicht gezeigt).

	<i>Bam</i> HI	<i>Apa</i> I	<i>Mva</i> I	<i>Pvu</i> II	<i>Eco</i> RI/ <i>Bg</i> III	<i>Pst</i> I/ <i>Xho</i> I
Erwartete Fragmentgröße innerhalb der T-DNA (Spt 1xr 88)	7 kb	5 kb	2,9 kb	2,4 kb	-	-
Erwartete Fragmentgröße innerhalb der T-DNA (Spt 3xf 159)	13 kb	3,4 kb	2,9 kb	2,4 kb	-	-
Erwartete Fragmentgröße der invertierten Sequenzwiederholung	1,7 kb	1,1 kb	0,8 kb	0,7 kb	3,3 kb	3,1 kb
Erhaltene Fragmentgrößen (Spt 1xr 88)	7 + >10 kb	5 + >10 kb	2,9 + 0,8 kb	2,4 + 5 kb	4,9 kb	9 kb
Erhaltene Fragmentgrößen (Spt 3xf 159)	>10 + 1,7 kb	3,4 + 1,1 kb	2,9 + 0,8 kb	2,4 + 0,7 kb	3,3 kb	3,1 kb

Tabelle 3: Ergebnisse der Hybridisierungen von Membranen, auf die DNA der Linien Spt 1xr 88 oder Spt 1xr 159, gespalten mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Apa*I, *Mva*I, *Pvu*II, *Eco*RI/*Bg*III und *Pst*I/*Xho*I, transferiert worden war. Die Hybridisierung erfolgte mit einer RB-Sonde. Die erwarteten und erhaltenen Fragmentgrößen einer invertierten Sequenzwiederholung zweier T-DNAs RB an RB und der T-DNA internen Fragmente sind aufgeführt.

Ein weiterer Beweis für das Vorliegen einer invertierten Sequenzwiederholung wurde durch eine PCR-Analyse erbracht. Die flankierenden genomischen Bereiche der T-DNAs wurden durch inverse PCR bestimmt (Spt 1xr 88: Forsbach 2001, Spt 3xf 159: diese Arbeit). Die T-DNAs flankierende Oligonukleotide und ein für die LB spezifisches Oligonukleotid (LB1c) wurden für PCR-Experimente eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass beide flankierenden Oligonukleotide mit dem LB-Oligonukleotid ein Fragment ergaben. Damit lagen die beiden T-DNAs an einem Locus im *A. thaliana* Genom in invertierter Orientierung RB an RB vor (Abb. 9 a,b). Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte zeigte, dass bei der Linie Spt 1xr 88 eine Deletion der genomischen Sequenz von 37 bp, bei Spt 3xf 159 eine von 9 bp vorlag (Abb. 9 c,d). Vergleichbare Größen von Deletionen der genomischen *A. thaliana* Sequenz wurden bei vielen T-DNA-Linien gefunden (Forsbach 2001). Um den Einfluss der invertierten Sequenzwiederholung auf die Expression der SPT-Gene bestimmen zu können, wurden Northern-Blot-Experimente von Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen durchgeführt. Die T-DNAs der Linie Spt 1xr 88 lagen homozygot vor (4 SPT-Kopien), die der Linie Spt 3xf 159 hemizygot (6 Kopien), weil die Linie einen gametophytisch letalen Phänotyp aufwies, der vermutlich durch die Integration der T-DNAs in einem Gen verursacht wurde (3.2.2). Als Kontrollen wurden RNAs von für die T-DNA homozygoten Pflanzen der Linien Spt 2xf 107 (4 Kopien), Spt 3xf 147 (6 Kopien) und einer Linie, die zwei Spt 3xf-T-DNAs homozygot trug (Spt 3xf 118/SPT 3xf 147, 12 Kopien) aufgetragen.

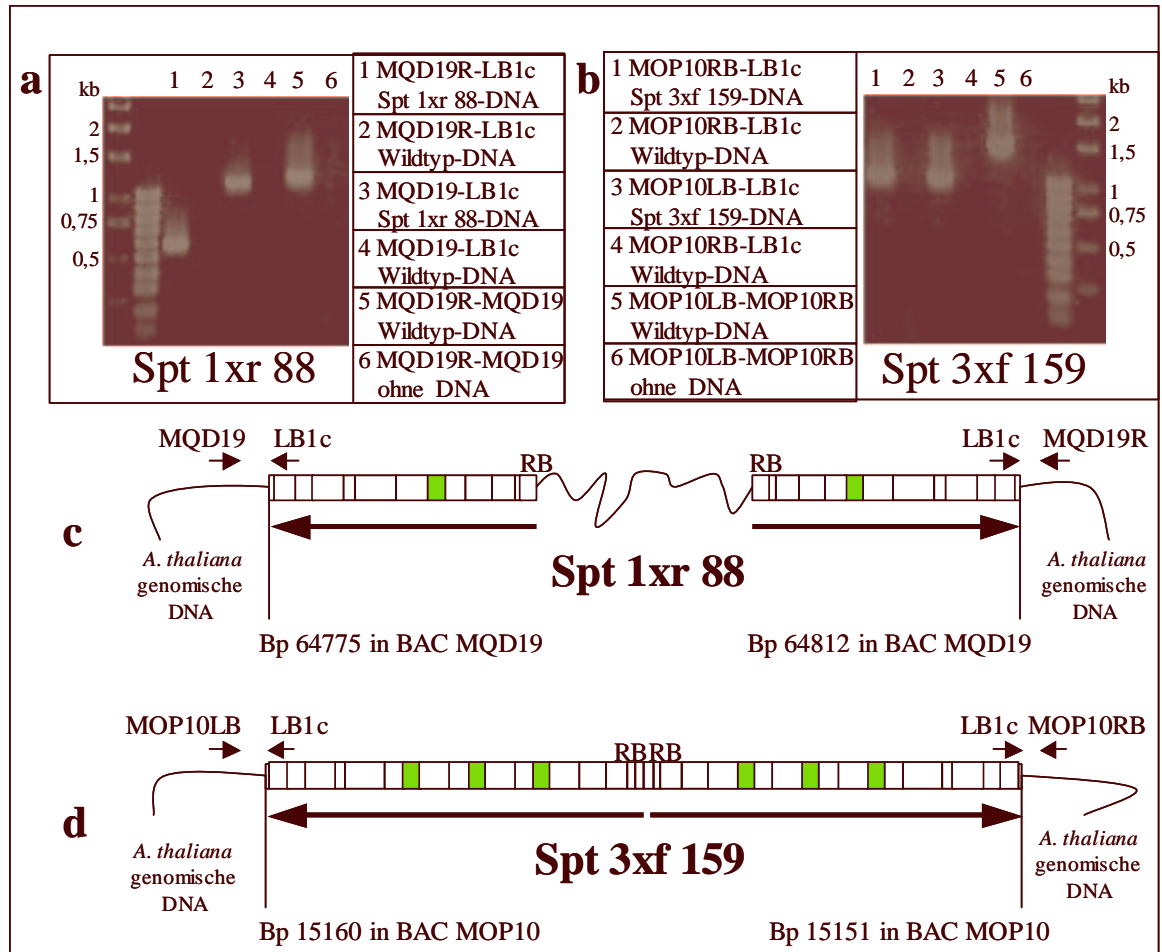


Abbildung 9: PCR-Analyse und Struktur der invertierten Sequenzwiederholungen zweier T-DNAs in den Linien Spt 1xr 88 (a) und c) und Spt 3xf 159 (b) und d)). a), b) PCR-Nachweis, dass eine invertierte Sequenzwiederholung vorliegt. Die flankierenden genomischen Oligonukleotide (MQD19, MQD19R bzw. MOP10LB, MOP10RB) mit dem LB-Oligonukleotid LB1c auf DNA der Linien Spt 1xr 88 bzw. Spt 3xf 159 ergeben in der PCR ein Produkt. c), d) Karte der invertierten Sequenzwiederholungen. Die codierende Sequenz der SPT-Gene ist grün dargestellt. Die Position der verwendeten Oligonukleotide ist angegeben. Die Größe und Entfernung der Oligonukleotide zueinander ist nicht maßstabsgetreu. Die Lage der flankierenden genomischen Sequenzen im BAC MQD19 bzw. MOP10 ist in bp angegeben. In der Linie Spt 1xr 88 liegt zwischen beiden T-DNAs ein nicht näher charakterisiertes DNA-Stück.

Bei der Linie Spt 1xr 88 ist eine ähnlich starke Hybridisierung wie bei der Linie Spt 2xf 107, bei der Linie Spt 3xf 159 eine vergleichbare Hybridisierung wie bei der Linie Spt 3xf 147 zu erkennen (Abb. 10). Bei der Linie mit 12 Kopien ist Silencing der SPT-Gene festzustellen. Die Actin-Hybridisierung zeigt vergleichbare Ladung mit Gesamt-RNA. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch dann eine hohe stabile Expression der SPT-Gene nachzuweisen ist, wenn die T-DNAs, auf denen die SPT-Gene liegen, als invertierte Sequenzwiederholungen vorliegen. Mögliche Sekundärstrukturen der DNA scheinen also keinen Einfluss zu haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei diesen Linien auch keine Methylierung der codierenden Sequenz und keine siRNAs der SPT-Gene nachzuweisen sind (Daten nicht gezeigt).

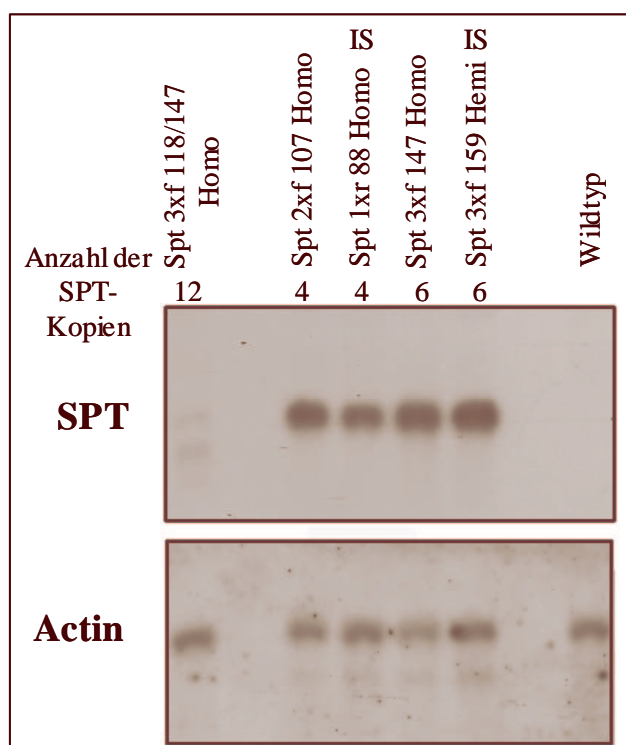


Abbildung 10: Northern-Blot-Analyse von Linien, die eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs enthalten. Die Anzahl der SPT-Kopien ist unter der Bezeichnung der Linien angegeben. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Membran wurde zuerst mit einer SPT-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer Actin-Sonde hybridisiert. Die Linien mit den invertierten Sequenzwiederholungen sind durch IS markiert.

3.3.6 Silencing der GUS-Reportergene tritt bei einer niedrigeren Kopienzahl als bei SPT-Reportergenen auf

Die GUS-Reportergene lagen in ähnlichen Konstellationen wie die SPT-Konstrukte vor (Abb. 1). Sie befanden sich ebenso unter der Kontrolle des 35S-Promotors und besaßen die 3'-Terminationsequenz des Octopin-Synthasegens aus *A. tumefaciens*. Auf den verschiedenen T-DNAs lagen GUS-Gene in ein (Gus 1xf, Gus 1xr), zwei (Gus 2xf, Gus 2xr) und drei (Gus 3xf, Gus 3xr) Kopien in beiden möglichen Orientierungen im Vergleich zum NPT-Gen vor. Die Konstrukte mit zwei oder drei Kopien enthielten die GUS-Gene in Tandem organisiert.

Es wurden Linien identifiziert, die nur eine intakte Kopie der T-DNA trugen (Gils 2000, Schubert 1999). Auf diese Weise konnten Linien etabliert werden, die zwei, 4 oder 6 Kopien des GUS-Gens enthielten, wenn die T-DNA homozygot vorlag, bzw. ein, zwei oder drei Kopien, wenn die T-DNA hemizygot vorlag. Zusätzlich wurde der Integrationsort der T-DNA im *A. thaliana* Genom für die meisten Linien bestimmt (Forsbach 2001, Gils 2000, Schubert 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Linien und die Position der T-DNAs im *A. thaliana* Genom sind in Tabelle 1 angegeben.

Um die Reportergenaktivität zu bestimmen, wurden β -Glucuronidase-Aktivitätstests von diesen Linien durchgeführt. Einerseits erfolgten quantitative, fluorometrische Messungen, andererseits wurde die Aktivität semiquantitativ colorimetrisch in Mikrotiterplatten nachgewiesen. Für die Aktivitätstests wurden Rosettenblätter von je zehn zwei, 5 oder 8 Wochen alten Pflanzen verwendet. Weiterhin wurden nur, wenn nicht anders erwähnt, Nachkommen von Pflanzen aus axenischer Kultur eingesetzt. Um Meßfehler und Variabilität des biologischen Materials untersuchen zu können, wurden für die quantitativen Messungen zwei Blattextrakte hergestellt und davon jeweils zwei Messungen durchgeführt.

Im folgenden wird die im Extrakt nachgewiesene Gesamt-Aktivität der β -Glucuronidase vereinfacht als GUS-Aktivität bezeichnet. Da bereits eine detaillierte Bestimmung der GUS-Aktivitäten der einzelnen Linien mit den Gus 1xf-, Gus 1xr-, Gus 2xf-, Gus 2xr-, Gus 3xf- oder Gus 3xr-Konstrukten erfolgt ist und besprochen wurde (Gils 2000, Schubert 1999), sollen an dieser Stelle die Ergebnisse zusammengefasst werden, weil sie für die weiteren Analysen von grundlegender Bedeutung sind. Zusätzlich werden Northern-Blot-Experimente und Untersuchungen in gametophytisch letalen Linien vorgestellt.

Die Linien, die für die Gus 1xr- oder Gus 1xf-T-DNA homozygot waren, also zwei Kopien des GUS-Gens trugen, zeigten eine hohe, stabile GUS-Aktivität in zwei, 5 und 8 Wochen alten Pflanzen (Abb. 11a). Die GUS-Aktivitäten der einzelnen Linien unterschieden sich um maximal einen Faktor drei (Gils 2000, Schubert 1999). Die Bestimmung der Position der T-DNAs im *A. thaliana* Genom zeigte T-DNA-Integrationen auf allen 5 *A. thaliana* Chromosomen (Tab. 1). Der Einfluss flankierender genomischer Bereiche ist also gering, wie auch schon für Linien mit bis zu 6 SPT-Genen gezeigt werden konnte (3.3.1). Ob grundsätzlich bei zwei GUS-Kopien hohe Expression beobachtet wird, unabhängig davon, ob sie auf homologen Chromosomen vorliegen, wird im folgenden Kapitel betrachtet (3.3.7).

Die Expressionsanalyse der transgenen Pflanzen, die 6 Kopien des GUS-Gens trugen (Gus 3xf- und Gus 3xr-T-DNA homozygot), zeigte im Vergleich zu den Gus 1xf- und Gus 1xr-Linien eine bis zu 5000 fache Reduktion der GUS-Aktivität bei allen unabhängigen Linien (Abb. 11a). Mit zunehmendem Alter wurde eine Abnahme der GUS-Aktivität festgestellt. GUS-Aktivität war auch in 8 Wochen alten Pflanzen noch nachweisbar.

Um zu zeigen, dass die geringere GUS-Aktivität in Linien mit 6 Kopien nicht auf posttranslationale Regulation zurückzuführen war, wurden Northern-Blot-Analysen von RNA aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass in Linien mit 6 GUS-Kopien wesentlich weniger, aber noch detektierbare GUS-mRNA-Mengen als in Linien mit zwei GUS-Kopien nachzuweisen war (Abb. 11b). Pflanzen mit 6 GUS-Kopien zeigten also Gen-Silencing.

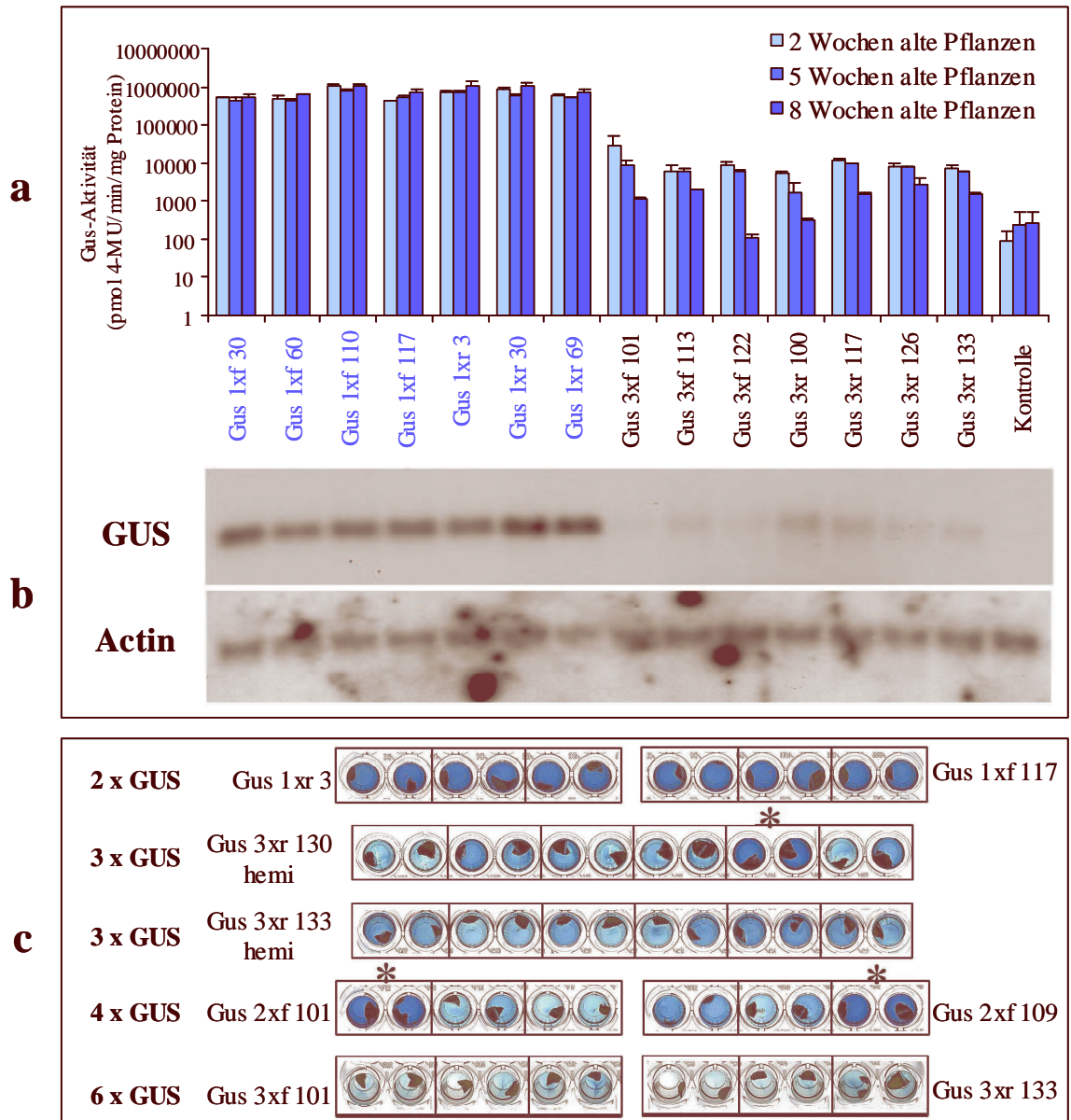


Abbildung 11: Expressionsanalyse von Linien, die verschiedene GUS-Kopienzahlen tragen. **a)** Vergleich der GUS-Aktivität von Linien, die das Gus 1xf-, Gus 1xr-, Gus 3xf- oder Gus 3xr-Konstrukt homozygot enthielten, zwei, 5 und 8 Wochen nach der Keimung. Es wurden bei jeder Messung aus jungen Blättern 10 verschiedener Pflanzen zwei Extrakte hergestellt, von denen je zwei Messwerte genommen wurden. Die Mittelwerte aus den vier Messungen sind dargestellt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Die Skalierung ist in logarithmischem Maßstab. Linien mit zwei GUS-Kopien haben eine blaue, Linien mit 6 GUS-Kopien eine schwarze Schrift. **b)** Northern-Blot-Analyse der unter a) aufgeführten Pflanzen. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer Actin-Sonde hybridisiert. **c)** Semiquantitative GUS-Aktivitätsmessungen von 5 Wochen alten Pflanzen mit zwei bis 6 GUS-Kopien. Es wurden jeweils zwei Blätter einer Pflanze über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Bei Linien, die eine variable GUS-Expression aufwiesen, sind Extrakte von Blättern mit Sternen markiert, die eine hohe GUS-Aktivität zeigten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Linien, die SPT-Gene trugen, war allerdings nur das Vollängentranskript in Pflanzen mit stillgelegten GUS-Genen nachzuweisen. Da eine Kor-

relation zwischen GUS-Aktivität und GUS-Expression gezeigt wurde, kann die GUS-Aktivität als Maß für die GUS-Expression dienen. Ob das Silencing der GUS-Gene wie das der SPT-Gene auch einem posttranskriptionellen Mechanismus unterliegt, wird in 3.3.9 geklärt.

Für die transgenen Pflanzen, die eine T-DNA der Konstrukte Gus 2xf oder Gus 2xr homozygot trugen, wurde auch Silencing der GUS-Gene gefunden, aber nicht immer bei allen Nachkommen einer Pflanze. In Abbildung 11c zeigen semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 5 Wochen alten Linien mit zwei Kopien (Gus 1xf 117 und Gus 1xr 3) starke Blaufärbung der Lösung, also hohe GUS-Aktivität, wohingegen bei Linien mit 6 Kopien (Gus 3xf 101 und Gus 3xr 133) nur geringe Blaufärbung zu erkennen ist. Bei Linien mit 4 Kopien (Gus 2xf 101, Gus 2xf 109) zeigen einige der Pflanzen eine hohe Aktivität, andere eine niedrige GUS-Aktivität. Diese Pflanzen sind isogene Nachkommen einer Pflanze und unter gleichen Bedingungen angezogen worden. Um zu untersuchen, ob das Silencing des GUS-Gens bereits bei drei Kopien ausgelöst wird, wurde die GUS-Aktivität der Linien Gus 3xr 130 (Abb. 11c) und Gus 3xr 136 (Daten nicht gezeigt) bestimmt, die einen vermutlich durch die Insertion der T-DNA in einem Gen verursachten gametophytisch letalen Phänotyp haben, so dass die T-DNA nie homozygot vorliegen kann. Diese Linien haben stets drei GUS-Kopien.

Transgene Pflanzen mit drei Kopien des GUS-Gens wurden auch durch Kreuzung von für die T-DNA homozygoten Pflanzen des Konstruktes Gus 3xr oder Gus 3xf mit Wildtyp *A. thaliana* erhalten. Allerdings war bei den Nachkommen dieser Kreuzungen nicht ausgeschlossen, dass das Silencing in für die T-DNA homozygoten Pflanzen meiotisch nicht reversibel ist. Sowohl bei den gametophytisch letalen als auch bei den für die T-DNA hemizygoten Linien mit den Gus 3xf- oder Gus 3xr-Konstrukten wurde Silencing der GUS-Gene bei allen Nachkommen einer Pflanze oder bei einem Teil der Nachkommen gefunden (Abb. 11c). Das Auftreten von nicht stillgelegten GUS-Genen in Nachkommen von Pflanzen, die Silencing aufwiesen, zeigte also meiotische Reversibilität.

Ursachen für das Silencing der GUS-Gene ab drei Kopien könnten die repetitive Anordnung der Gene auf der T-DNA, also mögliche Paarung homologer DNA-Sequenzen, oder eine erhöhte Transkript-Menge sein. Hierauf wird in 3.3.8 eingegangen.

Bei Pflanzen mit drei oder mehr Kopien des GUS-Gens zeigte sich zunehmendes Silencing mit fortschreitendem Alter. Beispielsweise zeigten Pflanzen, die nach 5 Wochen noch eine hohe Expression zeigten, häufig nach 8 Wochen Silencing (Daten nicht gezeigt).

Das Silencing der GUS-Gene wird im Gegensatz zum Silencing der SPT-Gene, wofür 9 (u.U. auch nur 7 oder 8) oder mehr Kopien benötigt werden, bereits bei 3 Kopien ausgelöst. Erklärungsansätze für diese Unterschiede werden in 3.3.10 gegeben.

3.3.7 Hohe GUS-Expression in Linien mit weniger als drei GUS-Kopien unabhängig von der Konfiguration der GUS-Gene

Wie schon an anderer Stelle gezeigt wurde, weisen Pflanzen, die eine T-DNA des Gus 1xf- oder Gus 1xr-Konstruktes homozygot tragen, etwa doppelt so hohe GUS-Aktivitätswerte wie Pflanzen auf, die dieselbe T-DNA hemizygot tragen (Gils 2000, Schubert 1999). Es besteht also eine positive Korrelation zwischen Kopienzahl des GUS-Gens und seiner Expression bei bis zu zwei Kopien des GUS-Gens. Daher trägt jedes GUS-Gen gleich zur Expression bei. Dies ist exemplarisch für Pflanzen der Linien Gus 1xf 117 und Gus 1xr 3 in Abbildung 12a gezeigt. Es sind nur die GUS-Werte von 8 Wochen alten Pflanzen dargestellt. Bei zwei und 5 Wochen alten Pflanzen war auch hohe GUS-Aktivität nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob zwei GUS-Gene unabhängig davon hohe GUS-Expression vermitteln, ob sie auf zwei homologen Chromosomen, an verschiedenen Loci oder an einem Locus in Tandem vorliegen. Dafür wurden Kreuzungen zwischen verschiedenen Linien, die das Gus 1xf- oder das Gus 1xr-Konstrukt homozygot tragen, vorgenommen (Gus 1xf 60 mit Gus 1xf 110, Gus 1xf 60 mit Gus 1xr 69 und Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69). Die jeweiligen T-DNA-Loci liegen in Nachkommen dieser Kreuzungen also hemizygot vor. Die Messungen der GUS-Aktivität ergaben vergleichbar hohe Werte wie von Pflanzen, die das Gus 1xf- oder Gus 1xr-Konstrukt homozygot trugen (Abb. 12a). Die GUS-Kopien der verschiedenen Loci tragen somit gleich zur Expression bei.

Auch in Tandem organisierte GUS-Gene vermittelten vergleichbar hohe GUS-Aktivität. Die Linie Gus 2xf 113, deren T-DNA nicht homozygot vorliegen konnte, da die Linie eine vermutlich durch die Integration der T-DNA in einem Gen verursachte Embryo-letale Mutation trug, wies hohe stabile GUS-Expression von den beiden in Tandem organisierten GUS-Genen auf. Auch in hemizygoten Nachkommen von Pflanzen, die eine Gus 2xf- oder Gus 2xr-T-DNA homozygot besaßen und damit Silencing der GUS-Gene aufwiesen, wurde hohe GUS-Aktivität nachgewiesen (Abb. 12a). Um die hemizygoten Nachkommen zu erhalten, wurden für die T-DNA homozygote Linien mit *A. thaliana* Wildtyp gekreuzt. Letztere Ergebnisse beweisen, dass das Silencing der GUS-Gene meiotisch reversibel ist und daher keinen Effekt auf die Expression der GUS-Gene der Nachkommen hat. Für alle weiteren transgenen Pflanzen, die das Gus 2xf-Konstrukt (9 Linien) oder das Gus 2xr-Konstrukt hemizygot (3 Linien) und an verschiedenen Positionen im *A. thaliana* Genom trugen, wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Schubert 1999). Sämtliche GUS-Aktivitätswerte reflektieren die GUS-mRNA-Mengen, wie in Northern-Blot-Analysen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

In Ausnahmefällen wurde auch bei einzelnen 8 Wochen alten Pflanzen, die zwei Kopien der GUS-Gene trugen, Silencing festgestellt (Abb. 12b). Beispielweise war die Pflanze der

Linie Gus 1xr 112, die geringere GUS-Aktivität zeigte, die einzige Pflanze mit verringerter GUS-Aktivität unter 185 Pflanzen verschiedener Linien, die zwei Kopien der GUS-Gene trugen (Daten nicht gezeigt). Noch seltener wurde Silencing der GUS-Gene in zwei Wochen alten Pflanzen mit zwei GUS-Kopien nachgewiesen (Gils 2000).

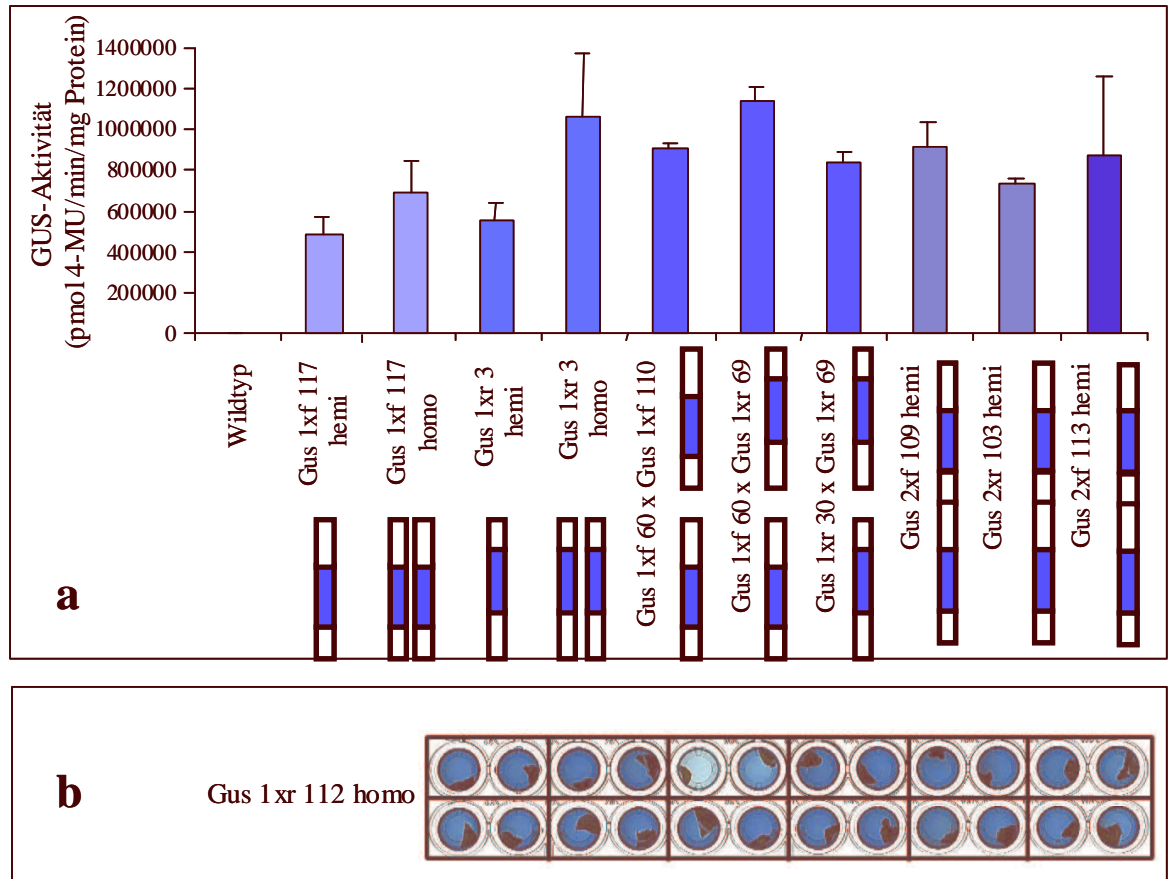


Abbildung 12: a) Quantitativer Vergleich der GUS-Aktivität von Linien, die ein oder zwei GUS-Kopien in verschiedenen Konfigurationen enthielten, 8 Wochen nach der Keimung. Es wurden bei jeder Messung aus jungen Blättern 10 verschiedener Pflanzen 2 Extrakte hergestellt, von denen je zwei Messwerte genommen wurden. Die Mittelwerte aus den vier Messungen sind dargestellt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Die Konfiguration und Kopienzahl der GUS-Gene ist neben der Linienbezeichnung symbolisch dargestellt. b) Semiquantitativer GUS-Aktivitätstest von 8 Wochen alten, für die T-DNA homozygoten Nachkommen der Linie Gus 1xr 112. Es wurden jeweils 2 Blätter einer Pflanze über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert.

3.3.8 Das Silencing der GUS-Gene wird durch Erhöhung der GUS-Transkript-Menge ausgelöst

In 3.3.6 wurden Experimente vorgestellt, die zeigten, dass in Linien, die mindestens drei Kopien eines GUS-Gens aufwiesen, Silencing der GUS-Gene zu beobachten war. In diesen Untersuchungen waren die GUS-Gene in Tandem kloniert. Zwar wurde gezeigt, dass zwei in Tandem organisierte GUS-Gene (3.3.7) oder drei in Tandem organisierte SPT-Gene hohe GUS-Expression verleihen (3.3.1. 3.3.2). Allerdings konnte nicht ausgeschlossen wer-

den, dass die repetitive Organisation von drei GUS-Kopien das Silencing durch Paarung der GUS-DNA-Sequenzen auslöst. Daher wurden Kreuzungen zwischen Linien, die verschiedene Kopienzahlen des GUS-Gens trugen, durchgeführt. Auf diese Weise wurden Nachkommen erhalten, die drei bis 6 Kopien des GUS-Gens enthielten. Im folgenden wird nur auf die Linien, die drei Kopien des GUS-Gens aufwiesen, eingegangen. Durch Kreuzung von Linien, die ein Gus 2xf- oder Gus 2xr-Konstrukt trugen, mit Linien, die ein Gus 1xf- oder Gus 1xr-Konstrukt besaßen, wurden Pflanzen erhalten, die an einem Locus zwei Kopien des GUS-Gens in Tandem, an dem anderen eine Kopie des GUS-Gens enthielten. Weiterhin wurden Pflanzen erzeugt, die drei Kopien des GUS-Gens an verschiedenen Loci im *A. thaliana* Genom aufwiesen. Diese Linien wurden erhalten, indem Pflanzen, die zwei Gus 1xf- oder Gus 1xr-T-DNAs homozygot enthielten, also 4 Kopien des GUS-Gens besaßen, mit Linien gekreuzt wurden, die eine Kopie der Gus 1xf- oder Gus 1xr-T-DNA homozygot aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Daher enthielten diese Linie jeweils eine T-DNA der Linien Gus 1xf 60, Gus 1xf 110 und Gus 1xf 117 bzw. Gus 1xr 3, Gus 1xr 30 und Gus 1xr 69. Liegt die T-DNA dieser Linien hemi- oder homozygot vor (ein oder zwei GUS-Kopien), wurde hohe GUS-Aktivität festgestellt (3.3.6, 3.3.7). Es zeigte sich, dass bei allen Linien, die drei Kopien des GUS-Gens trugen, Silencing der GUS-Gene ausgelöst wurde, unabhängig davon, ob die drei Kopien an drei verschiedenen Loci (Gus 1xf 60/110/117 Hemi, Gus 1xr 3/30/69 Hemi), an zwei unterschiedlichen Positionen (Gus 1xf 60 x Gus 2xr 125, Gus 1xr 30 x Gus 2xr 125) oder auf einer T-DNA lagen (Gus 3xr 100 Hemi, Gus 3xr 133 Hemi) (Abb. 13a). Linien mit zwei Kopien des GUS-Gens zeigten hohe Expression (Gus 1xf 60/110 Hemi, Gus 1xr 30/69 Hemi).

Diese Experimente bestätigen die mit zwei in Tandem organisierten GUS-Genen erhaltenen Ergebnisse, dass das Silencing der GUS-Gene nicht durch die repetitive Organisation der GUS-Gene ausgelöst wird. Das Hinzufügen von einer das GUS-Gen hoch exprimierenden Kopie zu zwei hoch exprimierenden Kopien des GUS-Gene führt zum Silencing aller drei Kopien. Da in 3.3.7 gezeigt wurde, dass alle Kopien des GUS-Gens gleich zur Expression beitragen, ist ein wichtiger Hinweis darauf erbracht, dass eine erhöhte Transkript-Menge Auslöser des Silencings ist. Das Silencing wird vermutlich durch Erhöhung der Transkript-Menge über einen Schwellenwert verursacht.

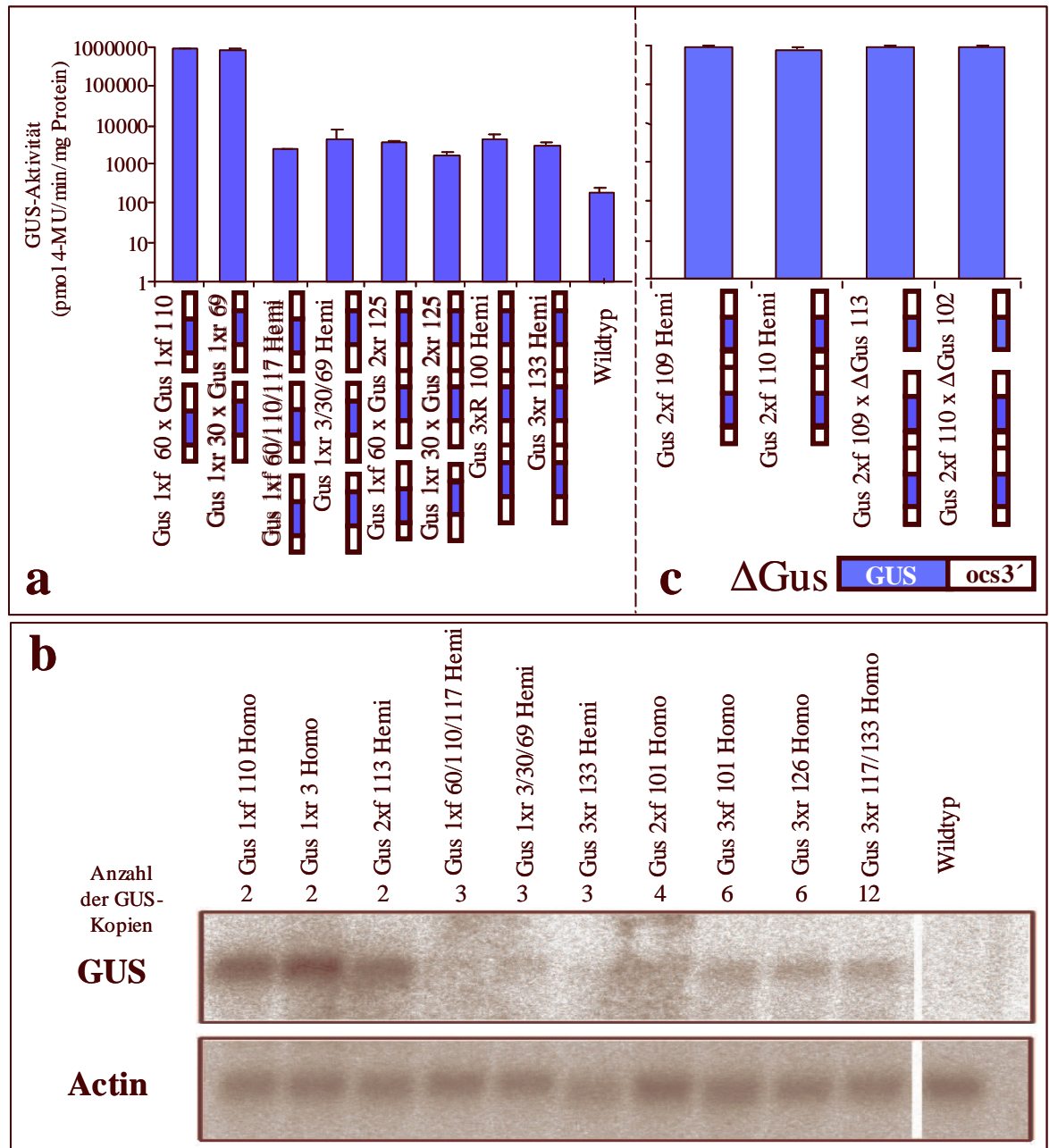


Abbildung 13: a) Quantitativer Vergleich der GUS-Aktivität von Linien, die zwei oder drei GUS-Kopien in verschiedenen Konfigurationen enthielten, 8 Wochen nach der Keimung. Es wurden bei jeder Messung aus jungen Blättern 10 verschiedener Pflanzen zwei Extrakte hergestellt, von denen je zwei Meßwerte genommen wurden. Die Mittelwerte aus den vier Messungen sind dargestellt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Es ist eine logarithmische Skalierung gewählt. Die Konfiguration und Kopienzahl der GUS-Gene ist neben der Linienbezeichnung symbolisch dargestellt. b) Northern-Blot-Analyse von Linien, die zwei bis 12 GUS-Kopien in verschiedenen Konfigurationen enthielten. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und in einem Formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer Actin-Sonde hybridisiert. c) Quantitativer Vergleich der GUS-Aktivität von Linien, die zwei Kopien des GUS-Gens enthielten, und von Linien, die zwei Kopien des GUS-Gens und ein promotorloses GUS-Gen aufwiesen, 8 Wochen nach der Keimung. Es wurde dieselbe Skalierung wie in a) verwendet. Das promotorlose GUS-Konstrukt ΔGUS ist schematisch dargestellt.

Dass das Silencing der GUS-Gene auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen ist, wurde mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse gezeigt (Abb. 13b). In Linien mit zwei Kopien des GUS-Gens (Gus 1xf 110, Gus 1xr 3, jeweils homozygot, bzw. Gus 2xf 113, hemizygot) war eine starke Hybridisierung mit einer radioaktiven GUS-Sonde zu erkennen, wohingegen bei Linien mit drei (Gus 1xf 60/110/117, Gus 1xr 3/30/69, Gus 3xr 133, jeweils hemizygot), 4 (Gus 2xf 101 homozygot), 6 (Gus 3xf 101, Gus 3xr 126, jeweils homozygot) und 12 GUS-Kopien (eine Linie, die die beiden T-DNAs der Linien Gus 3xr 117 und Gus 3xr 133 jeweils homozygot trug) nur geringe GUS-mRNA-Mengen nachgewiesen wurden.

Interessanterweise war die nachgewiesene GUS-mRNA-Menge der Linien, die Silencing aufwiesen, trotz unterschiedlicher Kopienzahlen vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass eine Restmenge an mRNA unabhängig von der Kopienzahl der inaktivierten GUS-Gene bestehen bleibt, ähnlich wie bei stillgelegten SPT-Genen gezeigt (3.3.3).

Ein weiterer Beweis dafür, dass das Silencing der GUS-Gene nicht durch Paarung homologer DNA-Sequenzen ausgelöst wird, wurde durch Kreuzungen von Pflanzen, die das Gus 2xf-Konstrukt tragen, mit Linien erbracht, die ein promotorloses GUS-Gen enthalten, so dass keine Transkription des GUS-Gens stattfindet (Δ Gus, Forsbach 2001). Das promotorlose GUS-Konstrukt ist bis auf das Fehlen des 35S Promotors identisch mit dem Gus 1xf Konstrukt. Pflanzen, die zwei transkribierte Kopien des GUS-Gens und ein promotorloses GUS-Gen enthalten (Gus 2xf 109/ Δ Gus 113, Gus 2xf 110/ Δ Gus 102), zeigten vergleichbar hohe GUS-Aktivität wie Pflanzen, die das Gus 2xf-Konstrukt hemizygot tragen, also zwei GUS-Kopien aufweisen (Gus 2xf 109 Hemi, Gus 2xf 110 Hemi) (Abb. 13c).

Die Einbringung eines hoch exprimierten GUS-Gens in Linien mit zwei hoch exprimierten GUS-Genen führt zum Silencing der GUS-Gene (Abb. 13a, b). Im Gegensatz dazu führt das Einbringen einer promotorlosen GUS-Kopie zu keinem Einfluss auf die Expression von zwei hoch exprimierten Genen (Abb. 13c). Die Experimente mit promotorlosen GUS-Kopien bestätigen die Ergebnisse, dass das Silencing der GUS-Gene durch die Erhöhung der GUS-Transkript-Menge ausgelöst wird.

3.3.9 Auch das Silencing der GUS-Gene beruht auf einem posttranskriptionellen Mechanismus

Auch beim Silencing der GUS-Gene stellte sich die Frage, ob es einem posttranskriptionellen oder transkriptionellen Mechanismus unterliegt. Da das Silencing wie bei den SPT-Genen durch eine erhöhte Kopienzahl verursacht wurde, konnte ein posttranskriptioneller Mechanismus postuliert werden. Es wurde ebenso eine Restmenge an GUS-mRNA nachgewiesen. Weiterhin wurden für PTGS-charakteristische Merkmale wie meiotische Reversibilität und Verstärkung des Silencings mit zunehmendem Alter gefunden. Zum definitiven Beweis von PTGS wurden Untersuchungen zur Methylierung der codierenden Se-

quenz des GUS-Gens und zum Nachweis von siRNAs des GUS-Gens unternommen. Die Methylierungsanalyse erfolgte mit den Restriktionsenzymen *HpaII* (Erkennungssequenz CCGG, wobei das Enzym nicht schneidet, wenn eines oder beide der Cytosine methyliert sind) (Abb. 14) und *AluI* (Erkennungssequenz AGCT; schneidet nicht bei Methylierung des Cytosin) (Abb. 15). *HpaII* schneidet also nicht bei symmetrischer Methylierung (CG- oder CNG-Methylierung, wobei N für jede beliebige Base steht), während *AluI* je nach 3'-zur Schnittstelle liegender Base nicht bei asymmetrischer (AGCTN; CNN-Methylierung) oder symmetrischer Methylierung (AGCTG; CNG-Methylierung) schneidet. Die *AluI*-Schnittstellen im 35S-Promotor (677 bp, AGCTA), im 5'-Bereich des GUS-Gens (983 bp, AGCTC) und im OCS-3' Bereich (3032 bp, AGCTC) könnten asymmetrisch methyliert vorliegen. Die Schnittstelle im 3'-Bereich des GUS-Gens (2249 bp, AGCTG) würde dagegen symmetrische Methylierung zeigen (Abb. 15). Für die Analyse wurde DNA aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit einer GUS-5'-, einer GUS 3'- und einer *Ds*-3'-Sonde hybridisiert (Abb. 14, 15). Die Hybridisierung mit der *Ds*-3'-Sonde erfolgte zur Überprüfung des vollständigen Schneidens der DNA.

Die Restriktionsanalysen mit *HpaII* und *AluI* zeigten bei den Linien, die Silencing aufwiesen, Methylierung des transkribierten Bereichs des GUS-Gens (Abb. 14, 15). Bei allen Linien wurden auch vollständig gespaltene GUS-Fragmente detektiert. Die Hybridisierung mit der GUS-5'-Sonde ergaben keine zusätzlichen Informationen bei der *HpaII*-Spaltung, daher ist nur die Hybridisierung mit der GUS-3'-Sonde gezeigt. Die GUS-Gene der Linien Gus 1xf 117, Gus 1xr 3 und Gus 2xf 113 (hemizygot) wiesen erwartungsgemäß keine Methylierung auf, da sie hohe Expression des GUS-Gens zeigten. Erstaunlicherweise konnte in den ebenfalls hoch exprimierenden Pflanzen der für die T-DNA hemizygoten Linie Gus 2xf 110 Methylierung der *HpaII*-Schnittstellen bei 2308 bp und 2597 bp festgestellt werden. Diese Pflanzen wurden durch Kreuzung einer für die T-DNA homozygoten Gus 2xf 110-Pflanze, die aufgrund der 4 GUS-Kopien Silencing und daher auch Methylierung aufwies, mit einer *A. thaliana* Wildtyp Pflanze erhalten. Möglicherweise wurde die Methylierung trotz Reversion des Silencings vererbt. Hierzu wurden weitere Experimente durchgeführt, die in 3.5 beschrieben sind. Die Linien, die drei GUS-Kopien (Gus 1xf 60/110/117, Gus 1xr 3/30/69, Gus 3xr 133 hemizygot) oder vier GUS-Kopien (Gus 2xf 101, Gus 2xf 110) enthielten, zeigten Methylierung der *HpaII*-Schnittstellen bei 2308 bp und 2597 bp, so dass sich Fragmente von 716 bp, 741 bp und 1168 bp ergeben. Bei den Linien mit 6 GUS-Kopien (Gus 3xf 101, Gus 3xr 133) und 12 GUS-Kopien (eine für die T-DNAs der Linien Gus 3xr 117 und Gus 3xr 133 homozygote Linie) sind noch größere Fragmente zu erkennen, die aus Methylierung von *HpaII*-Schnittstellen im 5'-und/oder im OCS-3'-

Bereich des GUS-Gens resultieren. Welche dieser Schnittstellen methyliert sind, ist aufgrund der Dichte an Schnittstellen nicht durch eine Analyse mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen zu klären (Abb. 14).

Die Analyse mit *AluI* offenbarte eine strikte Korrelation zwischen Methylierung und Silencing (Abb. 15). Linien, die hohe GUS-Aktivität aufwiesen, zeigten keine Methylierung (Gus 1xf 117, Gus 1xr 3, Gus 2xf 110 hemizygot, Gus 2xf 113). Linien mit drei oder 4 Kopien besaßen dagegen symmetrische Methylierung der Schnittstelle bei 2249 bp (2 kb Fragment). Die Linien mit höheren Kopienzahlen wiesen zusätzlich asymmetrische Methylierung der Schnittstelle im OCS-3'-Bereich bei 3032 bp auf (2,7 kb Fragment mit der GUS-5'-Sonde, 1,4 kb und 2,7 kb Fragmente mit der GUS-3'-Sonde (Abb. 15). Die *AluI*-Schnittstelle im 5'-Bereich des GUS-Gens war nicht methyliert (kein 1,6 kb Fragment mit der GUS-5'-Sonde). Dass die *AluI*-Schnittstelle im Promotorbereich nicht methyliert ist, wurde in weiteren Experimenten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Ob die mit *HpaII* und *AluI* nachgewiesenen Unterschiede bei Linien mit drei oder 4 GUS-Kopien und Linien mit 6 oder 12 Kopien wirklich stärkere Methylierung bei höherer Kopienzahl reflektieren, kann nicht geklärt werden, da die DNA dieser Linien aufgrund der höheren GUS-Kopienzahl auch stärkere Hybridisierung mit der GUS-Sonde zeigten. Dies ist teilweise durch die Hybridisierung mit der *Ds-3'*-Sonde zu erkennen. Die Intensitätsunterschiede sind nicht durch unterschiedliche Mengen an aufgetragener genomischer DNA, sondern durch verschiedene Kopienzahlen der T-DNAs bestimmt. Da pro T-DNA eine *Ds-3'*-Sequenz vorliegt, besitzen zum Beispiel für die T-DNA homozygote Linien zwei T-DNAs bzw. *Ds-3'*-Sequenzen und für die T-DNA hemizygoten Linien nur jeweils eine. Die Zahlen in den Abbildungen 14 und 15 geben die Anzahlen der T-DNAs bzw. *Ds-3'*-Bereiche und der GUS-Gene wieder.

Auch von zwei Wochen alten Pflanzen wurde die Methylierung der GUS-Gene untersucht. Es wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei 8 Wochen alten Pflanzen erhalten (Daten nicht gezeigt).

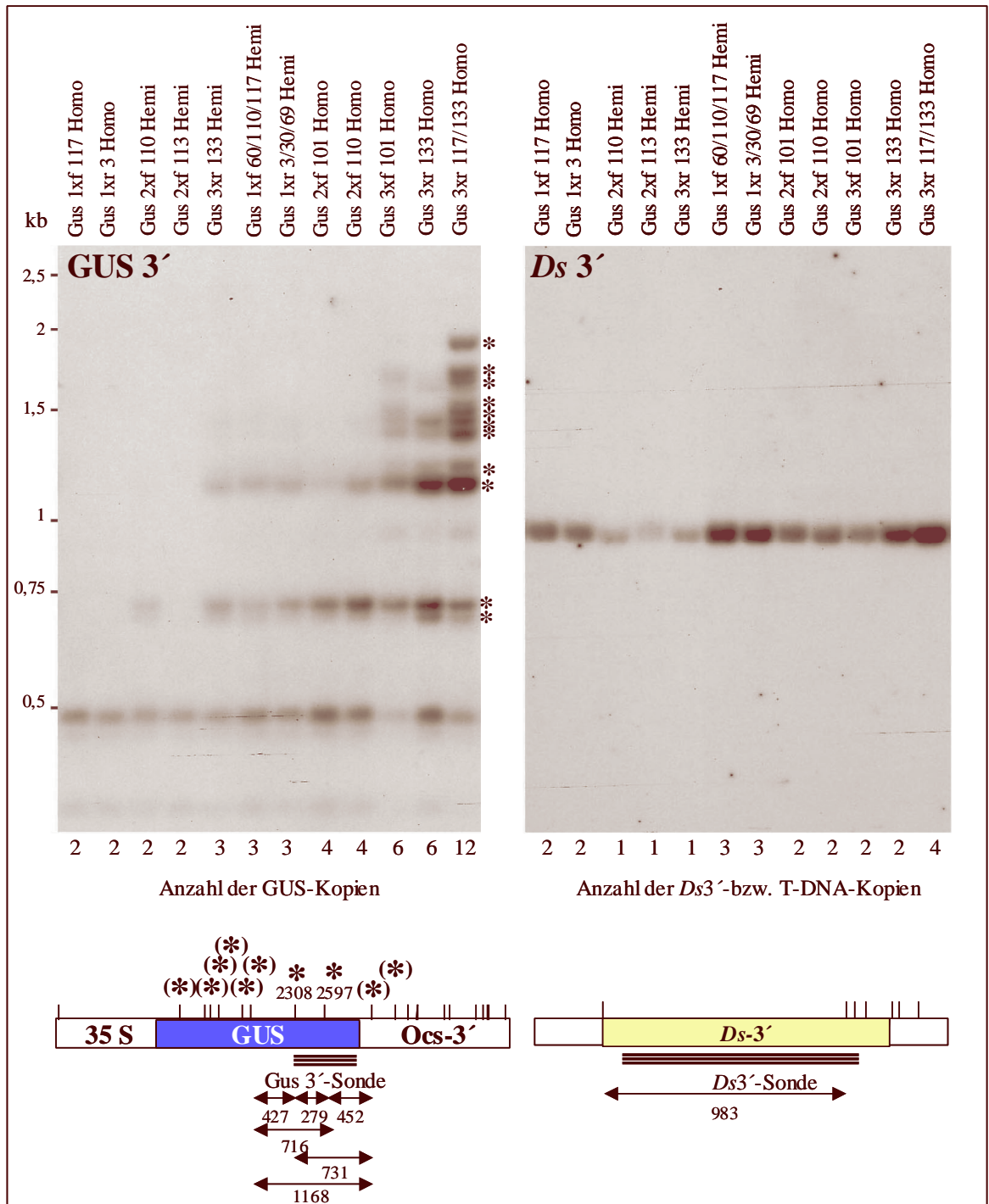


Abbildung 14: Methylierungsanalyse von Linien mit 2 bis 12 GUS-Kopien. Genomische DNA von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit *Hpa*II gespalten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS3'-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds*3'-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens der DNA. Es sind die Kopienzahlen der GUS-Gene und der T-DNAs bzw. *Ds*3'-Bereiche aufgeführt. Die Fragmente, die durch Methylierung von *Hpa*II-Schnittstellen erhalten wurden, und die methylierten Schnittstellen sind mit Sternen markiert. Eine Restriktionskarte mit einem Teil der erhaltenen Fragmente ist angegeben. Sterne in Klammern bedeuten, dass nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann, ob diese Schnittstellen methyliert sind.

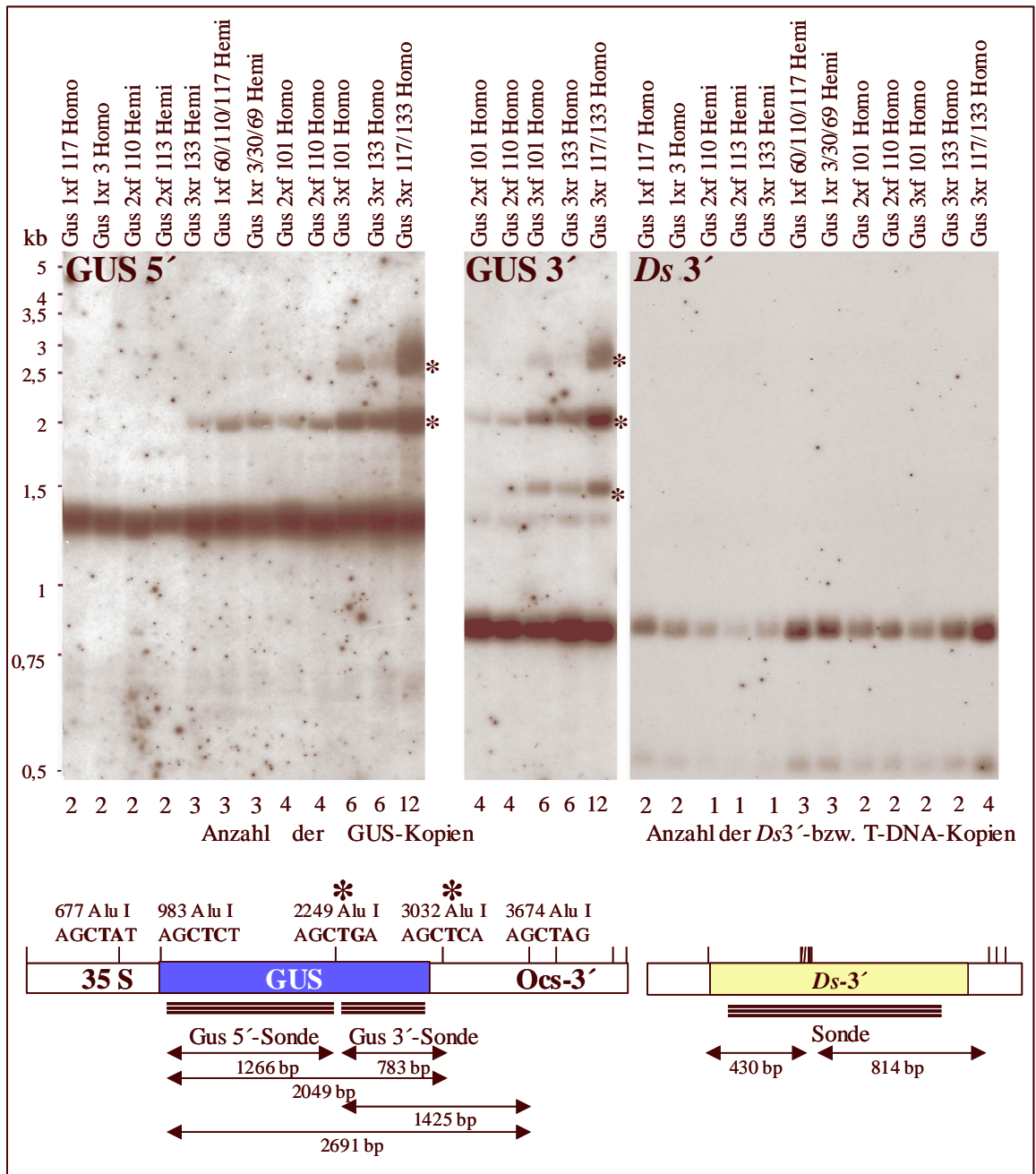


Abbildung 15: Methylierungsanalyse von Linien mit 2 bis 12 GUS-Kopien. Genomische DNA von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit *AluI* gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS3'-Sonde, nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds*-3'-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens der DNA und nach Abwaschen dieser Sonde mit einer GUS5'-Sonde. Es sind die Kopienzahlen der GUS-Gene und der T-DNAs bzw. *Ds*3'-Bereiche aufgeführt. Die Fragmente, die durch Methylierung von *AluI*-Schnittstellen erhalten wurden, und die methylierten Schnittstellen sind mit Sternen markiert. Eine Restriktionskarte mit der Größe der erhaltenen Fragmente ist angegeben. Die fettgedruckten Sequenzen zeigen, ob eine mögliche Methylierung des Cytosins in der *AluI*-Schnittstelle CNG- oder CNN-Methylierung ist.

Weiterhin wurden siRNAs nachgewiesen. Dafür wurde Gesamt-RNA isoliert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Niedrig und hochmolekulare RNAs wurden auf getrennte Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit einer Gus-5'-Sonde hybridisiert. Bei der Membran mit niedrig molekularen RNAs wurden als Größenstandard und Hybridisierungskontrolle jeweils 75 ng von Oligonukleotiden aufgetragen, die spezifisch für das GUS-Gen (GusR, 23 Basen und Gus1, 20 Basen). Diese wurden mit *A. thaliana* Wildtyp RNA gemischt. Die GUS-5'-Sonde hybridisiert mit beiden GUS-spezifischen Oligonukleotiden. Zusätzlich wurde die GUS-mRNA auf der Membran mit hochmolekularen RNAs nachgewiesen.

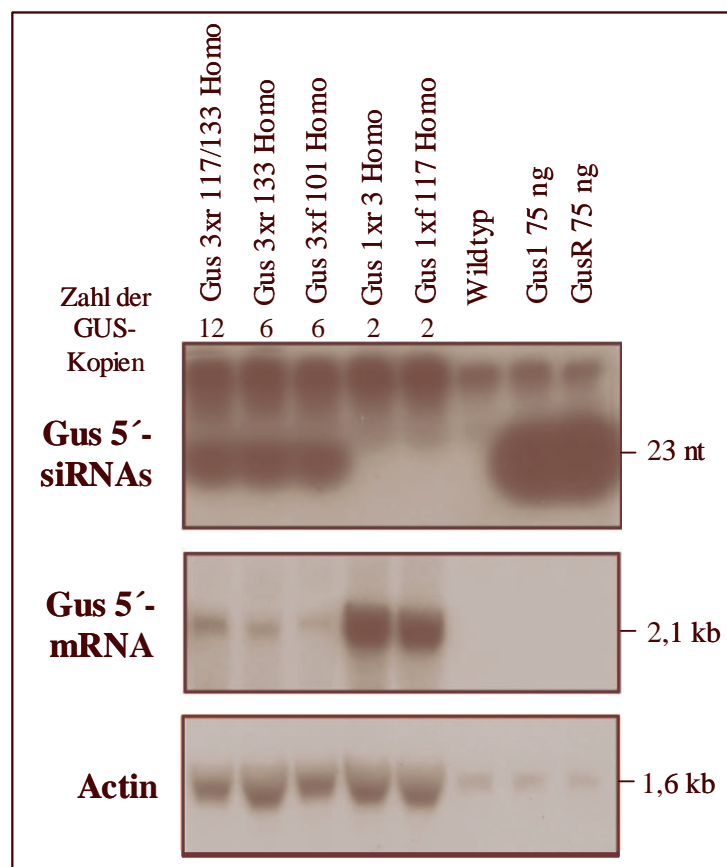


Abbildung 16: Nachweis von siRNAs in Linien, die Silencing der GUS-Gene aufwiesen. Gesamt-RNA wurde von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert und in einem Formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt. Das Gelstück mit RNAs unterhalb einer Größe von 200 Basen wurde abgetrennt. Diese RNAs wurden auf eine Membran transferiert. Die Polung der Gelkammer wurde danach vertauscht und so größere RNAs aufgetrennt. Diese wurden ebenfalls auf eine Membran transferiert. Erstere Membran wurde mit einer Gus5'-Sonde (siehe Abb. 15) bei 42 °C hybridisiert, letztere ebenfalls mit einer Gus5'-Sonde, aber bei 58 °C. Die geringe Hybridisierungstemperatur für die Membran mit den niedermolekularen RNAs führte zu unspezifischen Hybridisierungen mit RNAs im höhermolekularen Bereich als die siRNAs. Nach Entfernen der Sonde wurde die Membran mit hochmolekularen RNAs mit einer Actin-Sonde zur Standardisierung der Ladung der Gesamt-RNA hybridisiert. Als Größenstandard und Hybridisierungskontrolle wurden 75 ng der Gus1 und GusR-Oligonukleotide, gemischt mit Wildtyp-RNA, aufgetragen. Die Anzahl der GUS-Gene ist unterhalb der Linienbezeichnung angegeben.

In Linien, die Silencing aufwiesen (Gus 3xf 101 (6 GUS-Kopien), Gus 3xr 133 (6 Kopien), Gus 3xr 117/133 (12 Kopien)), waren siRNAs zu erkennen (Abb. 16). Bei den Linien, die kein Silencing zeigten, waren keine siRNAs nachzuweisen (Gus 1xf 117, Gus 1xr 3, jeweils 2 GUS-Kopien). Die Korrelation von GUS-Silencing und Auftreten von siRNAs ist eindeutig mit der Northern-Blot-Analyse bewiesen (Abb. 16). Mit einer GUS-3'-Sonde konnten auch siRNAs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente konnte bei allen Linien, die Silencing aufwiesen, symmetrische und zum Teil auch asymmetrische Methylierung und siRNAs der codierenden Sequenz des GUS-Gens aufgezeigt werden. Für das Silencing der GUS-Gene konnte damit wie für das Silencing der SPT-Gene der Nachweis erbracht werden, dass das Silencing auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht.

3.3.10 Das Silencing der GUS- und SPT-Gene wird bei unterschiedlichen Transkript-Mengen ausgelöst

Die Analyse der SPT- und GUS-Genexpression zeigte wesentliche Gemeinsamkeiten für beide Gene auf. Sie werden bis zu einer bestimmten Kopienzahl hoch und stabil exprimiert und weisen ab einer gewissen höheren Kopienzahl Silencing durch einen posttranskriptionellen Mechanismus auf. Ein bedeutender Unterschied besteht in der Zahl der Kopien, ab der Silencing von SPT- oder GUS-Genen ausgelöst wird. Für das SPT-Gen wurde Silencing ab 9 Kopien (möglicherweise auch ab 7 oder 8 Kopien), für das GUS-Gen ab drei Kopien festgestellt. Allerdings ist nicht die Kopienzahl direkt, sondern die Erhöhung der Transkript-Menge über einen bestimmten Schwellenwert der Auslöser. Daher könnte der Unterschied durch eine geringere Menge an SPT-mRNA als GUS-mRNA in Linien mit gleicher Kopienzahl der SPT- oder GUS-Gene oder durch einen unterschiedlichen Schwellenwert als Auslöser von Silencing bei ähnlichen Mengen an mRNA erklärt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass beide Gene unter dem 35S Promotor exprimiert wurden, was gleiche Transkription beider Gene und auch gleiche Mengen an mRNA nahe legt, aber nicht beweist.

Beide Gene tragen das zum Teil transkribierte OCS-3'-Ende. Daher konnte durch Hybridisierung einer Membran, auf die in einem Agarose-Gel aufgetrennte RNA von Gus 1xf-, Gus 1xr-, Spt 1xf- und Spt 1xr-Linien transferiert worden war, mit einer OCS-Sonde der direkte Mengen-Vergleich der GUS- und der SPT-mRNA erfolgen. Die RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen von jeweils für die T-DNA homozygoten Linien isoliert. Es ist deutlich zu erkennen, dass in Linien, die die GUS-Gene tragen, weniger starke Signale als in Linien, die die SPT-Gene aufweisen, festzustellen sind (Abb. 17a). Die Standardisierung mit einer Actin-Sonde zeigt vergleichbare Beladung. Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Phosphoimager (Abb. 17b). Hierfür wurde der Quotient

der Signalstärke der Hybridisierung mit der OCS-Sonde und der mit der Actin-Sonde gebildet. Die Unterschiede zwischen den SPT-Linien betragen maximal einen Faktor 2,1 (Spt 1xr 92 und Spt 1xf 114), zwischen GUS-Linien maximal einen Faktor 3,1 (Gus 1xf 30 und Gus 1xr 30). Der Vergleich der Mengen von GUS- und SPT-mRNA zeigt deutlich größere Unterschiede zwischen GUS- und SPT-Linien. Die Signalstärke der SPT-mRNA ist zwischen 1,5 mal (Spt 1xf 114 und Gus 1xr 30) und 10 mal (Spt 1xr 92 und Gus 1xf 30), durchschnittlich 3,5 mal, höher als die der GUS-mRNA. Für die SPT- und die GUS-Gene wurde gezeigt, dass jede Kopie gleich zur Expression beiträgt und ein additiver Gen-Dosis-Effekt bis zu einer bestimmten Kopienzahl besteht (3.3.2 bzw. 3.3.7). Daher ist davon auszugehen, dass die oben ermittelten Verhältnisse in Linien, die zwei Kopien der SPT- oder GUS-Gene tragen, auch für höhere Kopienzahlen zu erwarten sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass größere Mengen an SPT-mRNA als an GUS-mRNA für das Überschreiten eines Schwellenwertes benötigt werden, um Silencing der entsprechenden Gene auszulösen. Berücksichtigt man, dass eine durchschnittlich 3,5 mal höhere Menge an SPT-mRNA im Vergleich zur GUS-mRNA gefunden wird und Silencing der SPT-Gene bei einer 2,3 bis 3-fach höheren Kopienzahl (7, 8 oder 9 SPT-Gene im Vergleich zu drei GUS-Genen) ausgelöst wird, ergibt sich ein etwa 8 bis 10 mal höherer Schwellenwert für das Silencing der SPT-Gene.

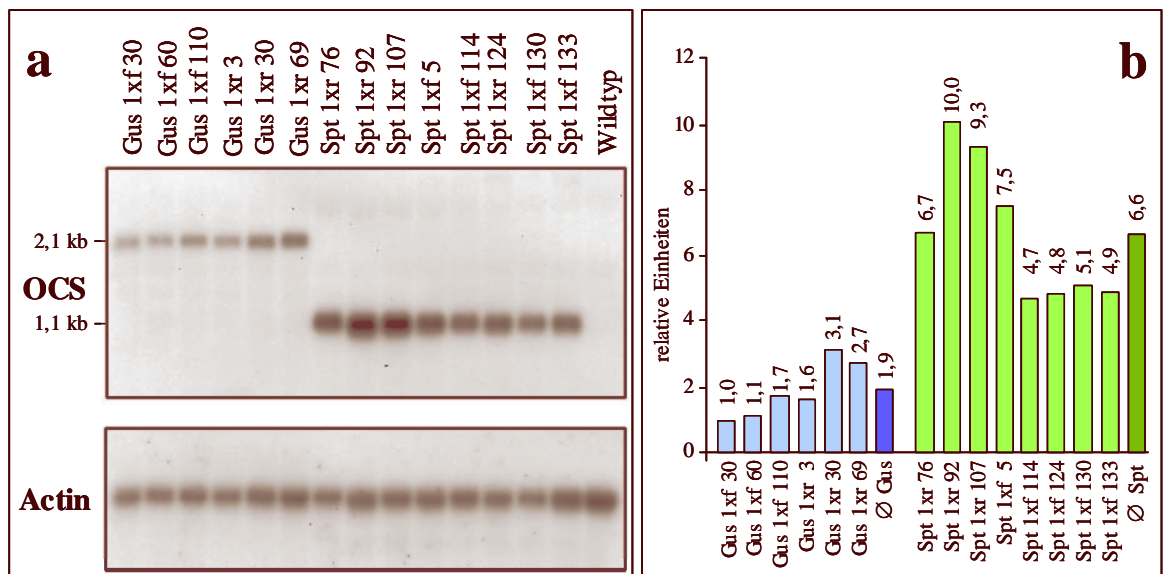


Abbildung 17: Northern-Blot-Analyse von für die T-DNA homozygoten Gus 1xf, Gus 1xr, Spt 1xr und Spt 1xf Linien. Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen isoliert und in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen. **a)** Hybridisierung der Membran mit der OCS-Sonde. Nach Abwaschen der Sonde wurde die Membran mit einer Actin-Sonde zur Standardisierung der Ladung der RNA hybridisiert. **b)** Quantitative Auswertung der Northern-Blot-Analyse. Es wurde der Quotient aus der relativen Schwärzung der Hybridisierung mit der OCS-Sonde und der relativen Schwärzung der Hybridisierung mit der Actin-Sonde gebildet. Zusätzlich ist die durchschnittliche Schwärzung für die Linien, die die SPT-Gene bzw. die GUS-Gene enthielten, aufgeführt. Die ermittelten Werte sind über den Balken angegeben.

3.4 Etablierung von transgenen *N. tabacum* Pflanzen und Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität

A. thaliana weist ein kleines Genom (125 Mb) mit relativ wenigen repetitiven DNA-Sequenzen (10 % des gesamten Genoms) auf und ist diploid (The *Arabidopsis* Genome Initiative). Bei vielen anderen Pflanzenarten, gerade auch Nutzpflanzen, findet man dagegen einen großen Anteil an repetitiven DNA-Sequenzen im Genom und Polyploidie (Dean und Schmidt 1995). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die in *A. thaliana* erhaltenen Erkenntnisse über Transgenexpression keine Gültigkeit in anderen Pflanzenarten aufgrund der unterschiedlichen Genomstruktur haben. *N. tabacum* besitzt ein relativ großes Genom (etwa 30 fach so groß wie das von *A. thaliana*) (Arugmugnathan und Earle 1991), einen hohen Anteil an repetitiven Sequenzen und einen tetraploiden Chromosomensatz. *N. tabacum* ist daher prädestiniert, um die Expression eines Transgens in einer Pflanze mit einer komplexen Genomstruktur zu analysieren. Um den Einfluss der Kopienzahl eines Transgens auf seine Expression zu untersuchen, wurden daher mit Hilfe von Agrobakterien-vermittelter Blattstückchentransformation die Konstrukte Gus 2xf oder Gus 3xr in *N. tabacum* Pflanzen eingebracht. Pflanzen, die mit Konstrukten mit nur eine Kopie des GUS-Gens transformiert wurden, wurden an anderer Stelle bearbeitet (Lechtenberg unveröffentlicht).

3.4.1 Identifizierung von transgenen *N. tabacum* Pflanzen, die nur eine intakte Kopie der T-DNA tragen

Für die Analyse des Einflusses der Kopienzahl des GUS-Gens auf seine Expression sollten auch in Tabak Linien identifiziert werden, die nur eine Kopie der T-DNA mit verschiedenen Reporterengenanzahlen trugen. Nur so konnten definierte Kopienzahlen erhalten werden und Einflüsse durch komplexe T-DNA-Integrationen ausgeschlossen werden. Wie bereits beschrieben wurde (Schubert 1999), wurde Rekombination des Gus 3xr-Konstruktes u.a. zu Gus 2xr- und Gus 1xr-Konstrukten in *A. tumefaciens* gefunden. Infolgedessen wurden auch transgene *A. thaliana* Pflanzen identifiziert, die mit diesen rekombinierten Gus 3xr-Konstrukten transformiert worden waren (Tab. 4, Schubert 1999). Die Analyse der Reporterengenaktivität in diesen transgenen *A. thaliana* Pflanzen zeigte keine Unterschiede zu Linien, die mit einem entsprechenden Konstrukt (Gus 1xr oder Gus 2xr) transformiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Daher sprach nichts dagegen, die eventuell zu identifizierenden *N. tabacum* Pflanzen, die Rekombination des Gus 3xr- zu Gus 2xr- oder Gus 1xr-Konstrukten aufwiesen, aber nur eine Kopie der T-DNA mit intakten GUS-Genen enthielten, mit in die Expressionsanalyse einzubeziehen.

Detaillierte Southern-Blot-Analysen von DNA der *N. tabacum* Primärtransformanten wurden unternommen, um Linien zu identifizieren, die nur eine intakte Kopie der T-DNA ent-

hielten. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden alle transgenen Pflanzen, die nur eine intakte Kopie der T-DNA aufwiesen, in der folgenden Generation erneut untersucht. Da die Southern-Blot-Analyse vergleichbar mit der in *A. thaliana* durchgeführt wurde und letztere an anderer Stelle eingehend beschrieben wurde (Gils 2000, Schubert 1999), soll hier nur ein kurzer Überblick über die Etablierung der transgenen Linien gegeben werden. Insgesamt konnten 55 unabhängige transgene Pflanzen aus der Transformation mit dem Gus 2xf-Konstrukt und 96 Linien aus der Transformation mit dem Gus 3xr-Konstrukt erhalten werden (Tab. 4). Die Southern-Blot-Analyse der transgenen Pflanzen ergab in *N. tabacum* für beide Konstrukte einen wesentlich geringeren prozentualen Anteil an transgenen Pflanzen, die nur eine Kopie der T-DNA mit intakten GUS-Genen enthielten, als in *A. thaliana* (Tab. 4). Für das Gus 2xf-Konstrukt waren dies lediglich zwei Linien (3,6 %, *A. thaliana* 19,6 %), für das Gus 3xr Konstrukt 10 Linien (10,4 %, *A. thaliana* 26,3 %). Nur 5 der 10 *N. tabacum* Linien, die durch Transformation mit dem Gus 3xr-Konstrukt erhalten worden waren und eine Kopie der T-DNA aufwiesen, trugen drei intakte Kopien des GUS-Gens. Zwei Linien zeigten das Hybridisierungsmuster für das Gus 2xr-Konstrukt und drei Linien das für das Gus 1xr-Konstrukt.

	Anzahl der untersuchten Pflanzen	Anzahl der Linien mit einer Kopie der T-DNA mit intakten GUS-Genen	Davon Gus 3xr	Davon Gus 2xf	Davon Gus 2xr	Davon Gus 1xr
Gus 2xf <i>N. tabacum</i>	55	2 (3,6 %)	-	2	-	-
Gus 2xf <i>A. thaliana</i>	56	11 (19,6 %)	-	11	-	-
Gus 3xr <i>N. tabacum</i>	96	10 (10,4 %)	5	-	2	3
Gus 3xr <i>A. thaliana</i>	38	10 (26,3 %)	7	-	3	-

Tabelle 4: Zusammenfassung der Southern-Blot-Analyse von transgenen *N. tabacum* Linien, die mit dem Gus 2xf- oder Gus 3xr-Konstrukt transformiert worden waren. Zum Vergleich sind die Ergebnisse aufgeführt, die in *A. thaliana* erhalten wurden.

Die unterschiedlichen Frequenzen an Linien in *N. tabacum* bzw. *A. thaliana*, die nur eine Kopie der T-DNA mit intakten GUS-Genen enthielten, könnten damit zusammenhängen, dass der Großteil der transgenen *A. thaliana* Pflanzen durch Agrobakterien-vermittelte *in planta* Transformation erhalten wurde, wohingegen die transgenen *N. tabacum* Pflanzen durch Agrobakterien-vermittelte Blattstückchentransformation erzeugt wurden. Letztere erfordert die Differenzierung der Pflanzen aus Kallusgewebe.

3.4.2 Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen *N. tabacum* Pflanzen

Die Analyse der GUS-Aktivität der transgenen *N. tabacum* Pflanzen wurde in der T1-Generation durchgeführt. Die Primärtransformanten (T0) waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten ins Gewächshaus gepflanzt worden, daher konnten identische Wachstumsbedin-

gungen nicht garantiert werden. In *Arabidopsis* wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung zum Teil unterschiedliche GUS-Expression nachgewiesen (3.3.6). Deshalb wurde eine detaillierte Expressionsanalyse der Tabaklinien in der T1 durchgeführt. Die T1-Pflanzen sind Nachkommen von hemizygoten Pflanzen, daher segregiert die T-DNA im Verhältnis 1:2:1 (keine T-DNA zu T-DNA hemizygot zu T-DNA homozygot), wenn nur ein T-DNA-Locus vorliegt. Durch Auslegen der Samen der Nachkommen auf Kanamycin-haltiges Medium konnten die Pflanzen identifiziert werden, die T-DNAs enthielten.

Für die Analyse der GUS-Aktivität ist daher zu berücksichtigen, dass für die T-DNA hemi- und homozygote Pflanzen untersucht wurden. Eine Unterscheidung dieser Pflanzen ist erst in der nächsten Generation mit Hilfe einer Segregationsanalyse möglich. Semiquantitative GUS-Aktivitätstests wurden von 3, 7 und 11 Wochen alten *N. tabacum* T1-Pflanzen durchgeführt. Die Analyse nach drei Wochen war von 16 Pflanzen in axenischer Kultur (jeweils zwei Blätter) unternommen wurden. Fünf dieser Pflanzen wurden ins Gewächshaus gepflanzt, und nach 7 und 11 Wochen nach der Keimung wurde von jeweils den gleichen 5 Pflanzen die GUS-Aktivität bestimmt (jeweils 4 Blattstücke). Die 4 Blattstücke wurden von den 4 jüngsten Blättern abgenommen. Bei drei Wochen alten Pflanzen, die eine Gus 1xr-T-DNA trugen, wiesen jeweils alle 16 Pflanzen der drei unabhängigen Linien hohe GUS-Aktivität auf (nur für jeweils 12 Pflanzen der Linien Gus 1xr 39-1 und Gus 1xr 95-1 gezeigt) (Abb. 18). Transgene Linien mit dem Gus 2xf- oder Gus 2xr-Konstrukt zeigten nach drei Wochen zum Großteil ebenfalls hohe GUS-Aktivität (Linien Gus 2xf 1-2 und Gus 2xr 33-1) (Abb. 19). Allerdings war bei wenigen Pflanzen eine erniedrigte GUS-Aktivität zu erkennen (Pflanzen 5 und 6 bei Gus 2xf 1-2 und Pflanze 11 bei Gus 2xr 33-1). Alle 5 Linien, die das Gus 3xr-Konstrukt enthielten, wiesen bei vielen Pflanzen Silencing der GUS-Gene auf (Linien Gus 3xr 7-1 und Gus 3xr 25-1) (Abb. 20).

Die in den Abbildungen 18, 19 und 20 dargestellten semiquantitativen GUS-Tests stehen repräsentativ für alle anderen Linien mit dem jeweiligen Konstrukt. Jeweils 5 der im semiquantitativen GUS-Test untersuchten Pflanzen (mit Zahlen versehen) wurden ins Gewächshaus gepflanzt. Einige der 7 Wochen alten Pflanzen, die die Gus 1xr-T-DNA trugen, zeigten verringerte GUS-Aktivität (Pflanze 1 bei Gus 3xr 39-1, Pflanzen 1 und 3 bei Gus 3xr 95-1) (Abb. 18). Pflanzen von Linien, die die Gus 2xf- oder Gus 2xr-T-DNA enthielten, wiesen zum Großteil niedrige GUS-Aktivität auf (Abb. 19). Bei allen Pflanzen, die eine oder zwei Kopien des Gus 3xr-Konstruktes enthielten, war nach 7 Wochen geringe GUS-Aktivität festzustellen (Abb. 20). 11 Wochen alte Pflanzen wiesen unabhängig von der Kopienzahl des GUS-Gens keine hohe GUS-Aktivität mehr auf, wobei bei Linien, die das Gus 3xr-Konstrukt trugen, kaum noch GUS-Aktivität nachweisbar war (Abb. 18, 19, 20).

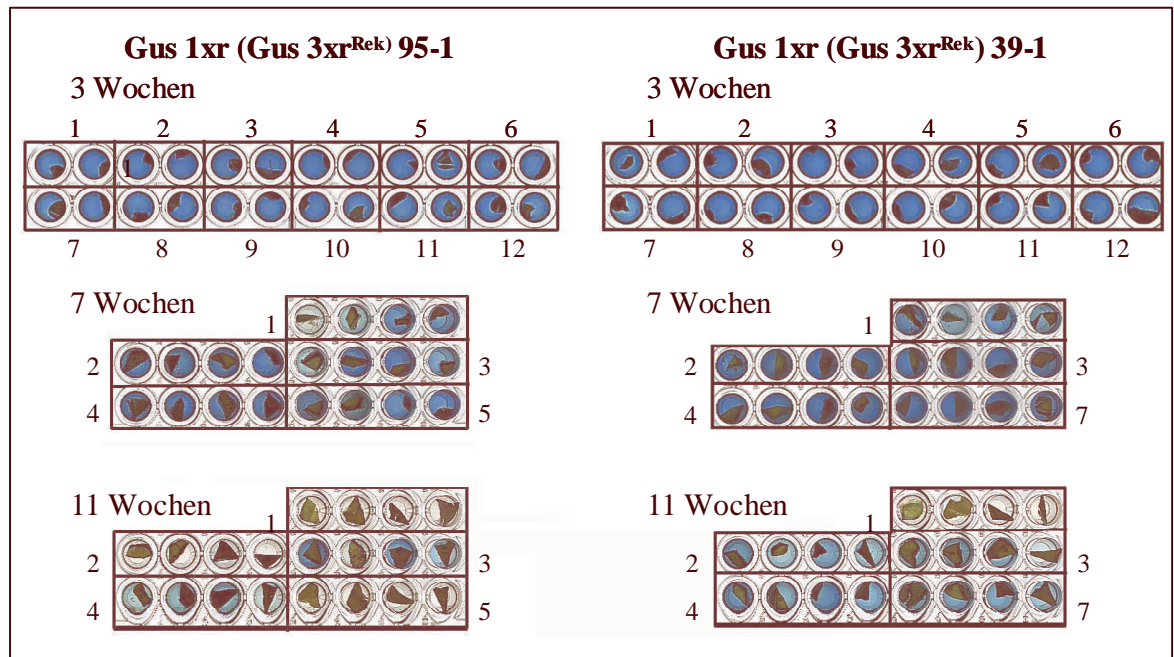


Abbildung 18: Semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 3, 7 und 11 Wochen alten *N. tabacum* Pflanzen, die ein Gus 1xr -Konstrukt enthielten. Die untersuchte Population besteht aus Pflanzen, die die T-DNA homo- oder hemizygot trugen. Es wurden jeweils 2 Blätter einer Pflanze (3 Wochen alte Pflanzen) oder 4 Blattstücke einer Pflanze (7 und 11 Wochen alte Pflanzen) über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Die einzelnen Nachkommen erhielten Nummern von 1 bis 12.

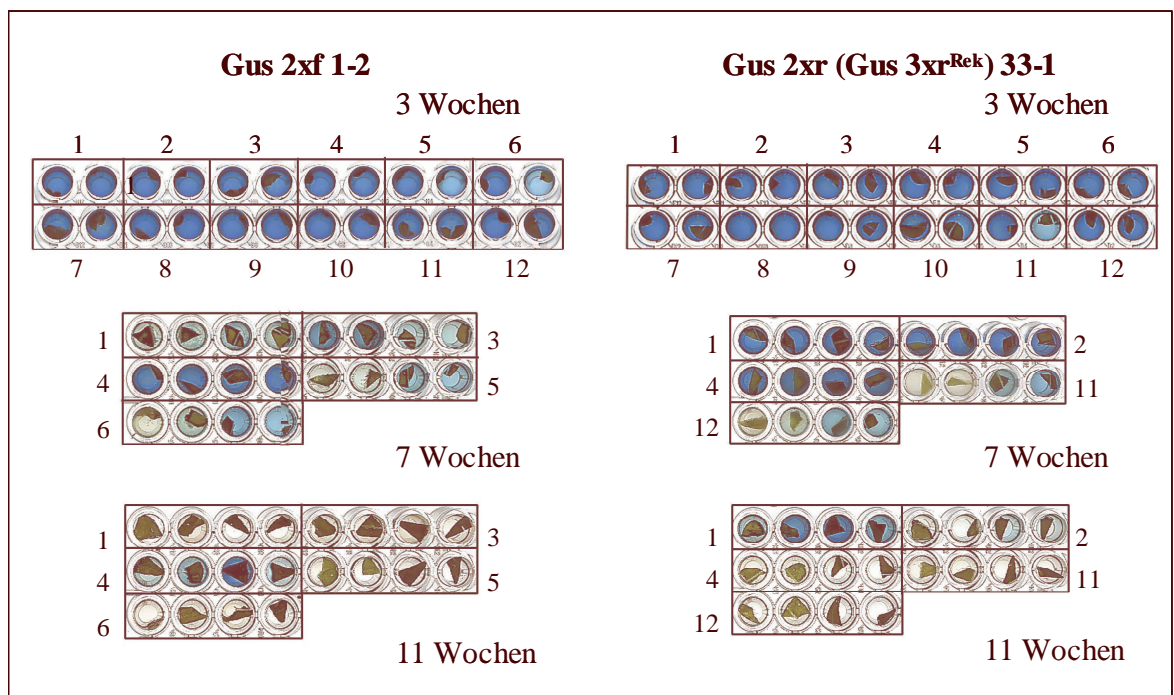


Abbildung 19: Semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 3, 7 und 11 Wochen alten *N. tabacum* Pflanzen, die ein Gus 2xf- oder Gus 2xr -Konstrukt enthielten. Die untersuchte Population besteht aus Pflanzen, die die T-DNA homo- oder hemizygot trugen. Es wurden jeweils 2 Blätter einer Pflanze (3 Wochen alte Pflanzen) oder 4 Blattstücke einer Pflanze (7 und 11 Wochen alte Pflanzen) über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Die einzelnen Nachkommen erhielten Nummern von 1 bis 12.

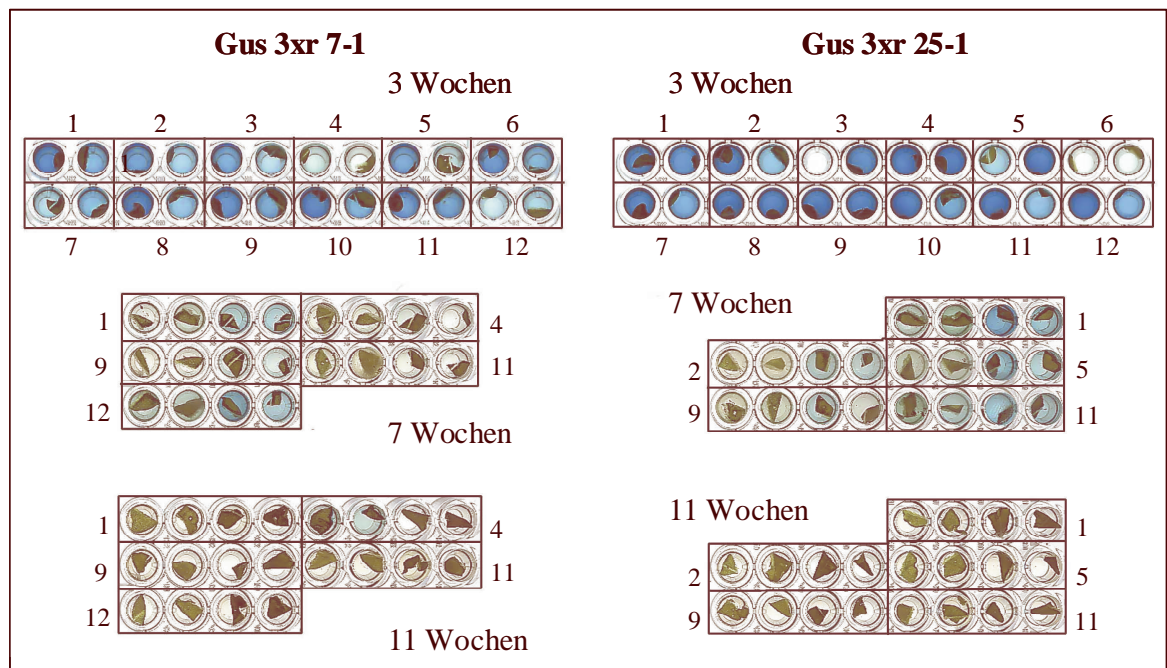


Abbildung 20: Semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 3, 7 und 11 Wochen alten *N. tabacum* Pflanzen, die ein Gus 3xr -Konstrukt enthielten. Die untersuchte Population besteht aus Pflanzen, die die T-DNA homo- oder hemizygot trugen. Es wurden jeweils 2 Blätter einer Pflanze (3 Wochen alte Pflanzen) oder 4 Blattstücke einer Pflanze (7 und 11 Wochen alte Pflanzen) über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Die einzelnen Nachkommen erhielten Nummern von 1 bis 12.

Von 7 Wochen alten Pflanzen, die im semiquantitativen GUS-Test eine hohe GUS-Aktivität aufwiesen, wurden auch quantitative Tests durchgeführt. Bei einem Großteil der gemessenen Extrakte zeigte sich aber eine große Variabilität, die vermutlich auf beginnendes Silencing zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Wie in *A. thaliana* wurde auch in *N. tabacum* gefunden, dass eine steigende Kopienzahl des GUS-Gens zu stärkerem Silencing führt. Allerdings wurde bereits bei ein oder zwei Kopien des GUS-Gens (es ist davon auszugehen, dass unter den analysierten Linien, die die Gus 1xr-T-DNA trugen, hemi- und homozygote Nachkommen waren) Silencing des GUS-Gens gefunden. Aufgrund der Zunahme des Silencings mit fortschreitendem Alter der Pflanzen und der meiotischen Reversibilität des Silencings (11 Wochen alte Pflanzen, die das Gus 1xr-Konstrukt enthielten, zeigten in der T0 ausnahmslos niedrige GUS-Aktivität (Daten nicht gezeigt), wohingegen 3 Wochen alte Pflanzen der T1 durchweg hohe GUS-Aktivität aufwiesen) ist von einem posttranskriptionellen Mechanismus des Silencings auszugehen.

Silencing der GUS-Gene wird wahrscheinlich wie in *A. thaliana* durch Erhöhung der GUS-Transkript-Menge über einen Schwellenwert ausgelöst. In *N. tabacum* wurde eine geringere Kopienzahl für das Auslösen von Silencing der GUS-Gene als in *A. thaliana* festgestellt.

3.5 Untersuchungen zur Methylierung des GUS-Gens und zum Nachweis von GUS-siRNAs in Linien mit hoher GUS-Expression

3.5.1 Methylierung des GUS-Gens ist nicht vollständig meiotisch reversibel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenhang mit posttranskriptionell stillgelegten Transgenen die Methylierung der codierenden Sequenz dieser Gene untersucht. Wurde PTGS des GUS-Gens gefunden, so wurde durchweg Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens nachgewiesen (3.3.9). Umgekehrt kann diese Aussage allerdings nicht gemacht werden, da bei einer Linie, die das Gus 2xf-Konstrukt hemizygot trug und hohe Expression der GUS-Gene aufwies (Linie Gus 2xf 110 Hemi in Abb. 14), Methylierung zweier *HpaII*-Schnittstellen im GUS-Gen nachgewiesen wurde. Alle Linien, die zwei Kopien des GUS-Gens besaßen, wiesen unabhängig von der Konstellation der GUS-Gene und unabhängig davon, ob sie Nachkommen von Linien mit stillgelegten oder hoch exprimierenden GUS-Genen waren, hohe Expression der GUS-Gene auf (3.3.7). Vereinzelt wurde allerdings in diesen Linien Silencing der GUS-Gene in 8 Wochen alten Pflanzen (3.3.7) und noch seltener in zwei Wochen alten Pflanzen (Gils 2000) nachgewiesen. Die Ursache für die Methylierung der GUS-Gene in der für die T-DNA hemizygoten Linie Gus 2xf 110 könnte daran liegen, dass die Pflanzen Nachkommen der für die T-DNA homozygoten, Silencing und daher Methylierung aufweisenden Linie Gus 2xf 110 waren und die Methylierung vererbt worden ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Silencing der GUS-Gene ausgelöst worden ist, aber noch nicht anhand der GUS-Aktivität nachgewiesen werden kann, da das GUS-Protein relativ stabil ist (Jefferson *et al.* 1987).

Für eine genetische bzw. epigenetische Analyse der Methylierung des GUS-Gens in hoch exprimierenden Linien waren zwei Arten von Linien prädestiniert (Abb. 22). Einerseits war die Linie Gus 2xf 113 sehr gut geeignet, weil sie einen Embryo-letalen Phänotyp zeigte (3.2.2) und daher die T-DNA stets hemizygot trug. Da diese Linie kein Silencing der GUS-Gene aufwies, weil sie nie mehr als zwei GUS-Gene enthielt, sollte keine Methylierung nachzuweisen sein, falls die Methylierung aus Silencing-aufweisenden Linien in hoch exprimierenden Nachkommen bestehen bleibt. In der in 3.3.9 vorgestellten Methylierungsanalyse waren bereits erste Hinweise erhalten worden, dass diese Linie keine Methylierung der GUS-Gene aufwies. Andererseits waren Nachkommen der Kreuzungen Gus 1xf 60 mit Gus 1xf 110 und Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69 hervorragend geeignet. Von diesen Kreuzungen wurden in der F2 Nachkommen identifiziert, die jeweils beide T-DNAs homozygot (4 GUS-Kopien) enthielten und daher Silencing aufwiesen. Falls die Methylierung meiotisch nicht oder nicht vollständig revertiert wird, würden Nachkommen einer Kreuzung dieser Linien (z. B. Gus 1xf 60/Gus 1xf 110, jeweils homozygot) mit Wildtyp zwar hohe GUS-Aktivität besitzen (zwei GUS-Kopien), aber Methylierung aufweisen

(Abb. 22). Wenn allerdings eine Kreuzung zwischen den für die T-DNA homozygoten Linien erfolgt (z. B. Gus 1xf 60 homozygot mit Gus 1xf 110 homozygot), die beide hohe GUS-Expression und keine Methylierung aufweisen sollten, sollte keine Methylierung des GUS-Gens und hohe GUS-Expression zu finden sein (Abb. 22). Die Nachkommen sind genetisch identisch mit den Nachkommen der oben aufgeführten Kreuzung. Falls die aufgestellte Hypothese sich als richtig erweisen sollte, würden sie sich aber epigenetisch unterscheiden, da sie ein unterschiedliches Methylierungsmuster zeigen. Außerdem wäre zu erwarten, dass in allen Linien, die die GUS-Gene hoch exprimieren und Nachkommen von Linien sind, die Silencing der GUS-Gene aufweisen, Methylierung der GUS-Gene zu finden ist.

Die Methylierungs- und Expressionsanalyse wurde von Rosettenblättern von zwei und 8 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Als Methylierungs-sensitives Restriktionsenzym wurde *HpaII* verwendet. Da keine Unterschiede des Methylierungsmusters in zwei und 8 Wochen alten Pflanzen gefunden wurden, wird an dieser Stelle nur die Methylierungsanalyse von zwei Wochen alten Pflanzen besprochen. Wie erwartet war in den Linien, die 4 GUS-Kopien trugen (Gus 2xf 101 homo, Gus 2xf 110 homo, Gus 1xf 60/110 homo, Gus 1xr 30/69 homo), Methylierung deutlich zu erkennen (Abb. 21). Ebenso wurde in den für die T-DNA hemizygoten Nachkommen dieser Linien trotz hoher GUS-Aktivität Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens nachgewiesen. Dabei war es nicht von Bedeutung, ob die beiden GUS-Kopien an zwei Loci (Gus 1xf 60/110 hemi, Gus 1xr 30/69 hemi) oder an einem Locus in Tandem (Gus 2xf 101 hemi, Gus 2xf 110 hemi) vorlagen. In der Linie Gus 2xf 113 dagegen, die ebenfalls zwei GUS-Kopien in Tandem und daher hohe GUS-Aktivität aufwies, war in Pflanzen zweier verschiedener Generationen (T3 und T6) keine Methylierung festzustellen. Zwar wurde wesentlich weniger DNA dieser Linie in die Analyse eingesetzt (Hybridisierung mit der *Ds*-3'-Sonde), allerdings war die DNA-Menge vergleichbar mit der der Linie Gus 2xf 101 hemi, in der trotz geringer DNA-Menge deutlich Methylierung zu erkennen war. In den Linien Gus 1xf 110 homo und Nachkommen der Kreuzung Gus 1xf 60 mit Gus 1xf 110 war keine Methylierung nachzuweisen. Die Pflanzen waren Nachkommen von Pflanzen, die das GUS-Gen hoch exprimierten. Im Gegensatz dazu war in der Linie Gus 1xr 30 und Nachkommen der Kreuzung Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69 Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens zu erkennen (s.u.). Die Hybridisierung der Membran mit der *Ds*-3'-Sonde zeigte vollständiges Schneiden aller DNAs (Abb. 21).

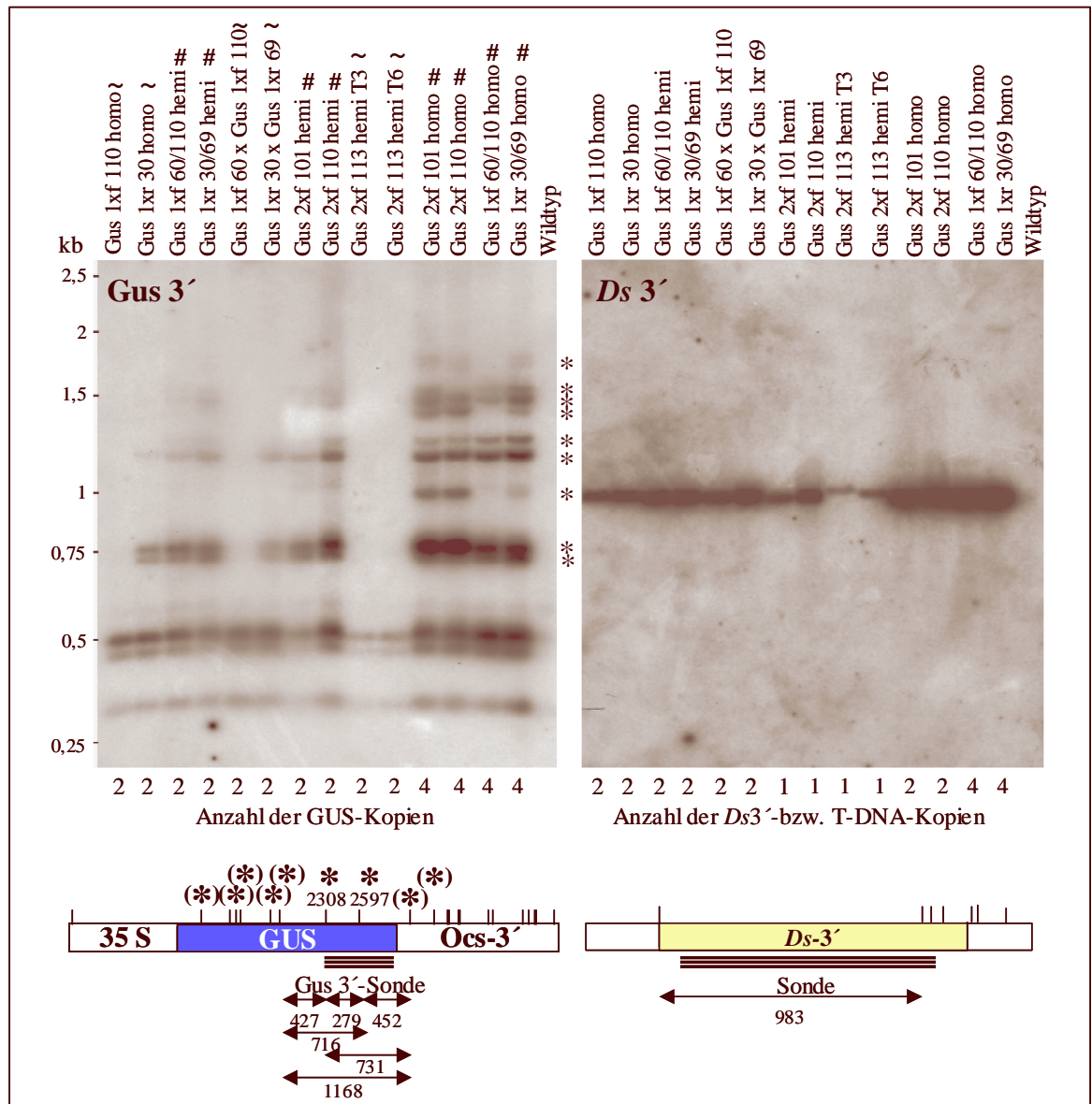


Abbildung 21: Methylierungsanalyse von Linien, die Nachkommen von GUS hoch oder niedrig exprimierenden Linien sind. Genomische DNA von 2 Wochen alten Pflanzen wurde mit *Hpa*II gespalten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS3'-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds*3'-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens des Enzyms. Es sind die Kopienzahlen der GUS-Gene und der T-DNAs bzw. *Ds*3'-Bereiche aufgeführt. Die Fragmente, die durch Methylierung von *Hpa*II-Schnittstellen erhalten wurden, und die methylierten Schnittstellen sind mit Sternen markiert. Eine Restriktionskarte mit einem Teil der erhaltenen Fragmente ist angegeben. Sterne in Klammern bedeuten, dass nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann, ob diese Schnittstellen methyliert sind. Die GUS-Expression der untersuchten Linien und die Erzeugung der durch Kreuzung erhaltenen Nachkommen sind in Abbildung 22 angegeben. ~ Nachkommen von GUS hoch exprimierenden Linien; # Nachkommen von GUS niedrig exprimierenden Linien.

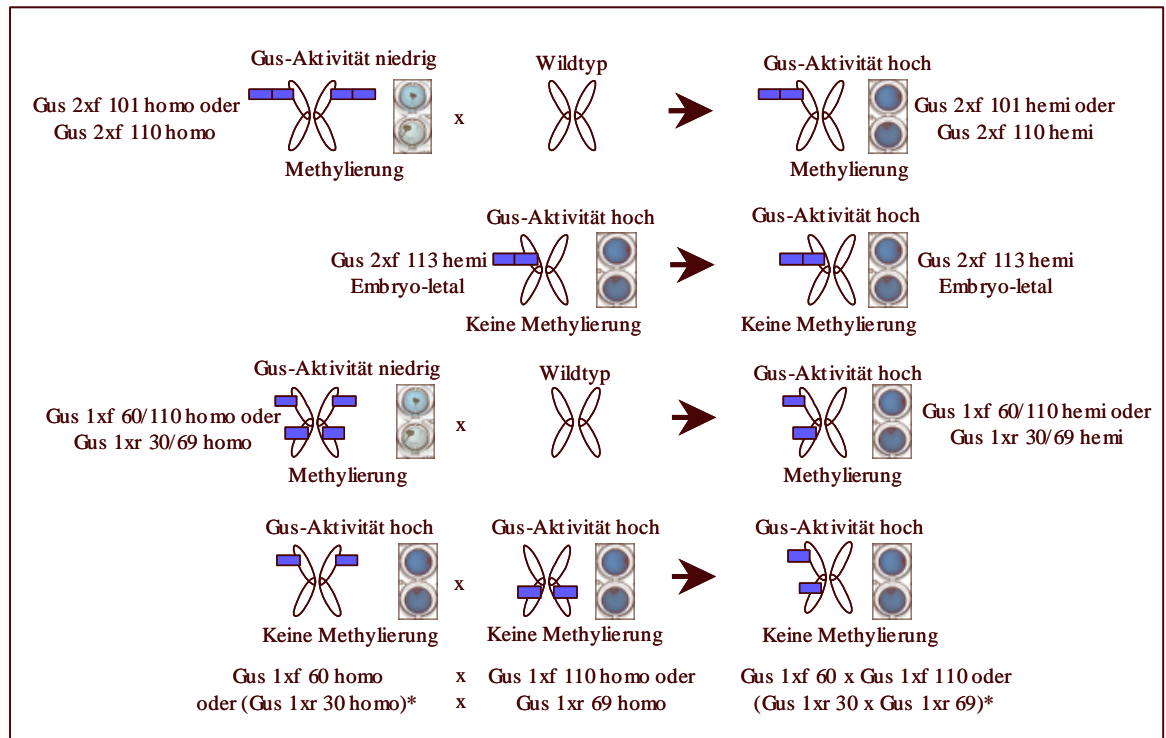


Abbildung 22: Zusammenfassung der Methylierungsanalyse von GUS hoch oder niedrig exprimierenden Linien der Abbildung 21. Die GUS-Gene sind symbolisch als blaue Kästen auf homologen Chromosomen (hantelförmige Figuren) dargestellt. Zusätzlich ist die GUS-Aktivität exemplarisch anhand eines semiquantitativen GUS-Tests aufgeführt. x gibt an, dass Linien miteinander gekreuzt wurden. Der Pfeil zeigt auf die Ergebnisse, die mit Nachkommen erhalten wurden. Der Methylierungsstatus der codierenden Sequenz der GUS-Gene der Linien ist angegeben. * Gus 1xr 30 und die Nachkommen der Kreuzung Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69 wiesen Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens auf.

Zusätzliche Evidenz, dass ein Teil der Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens meiotisch vererbt wird, kam von einer Methylierungsanalyse weiterer für die T-DNA hemizygoter Linien, die das Gus 2xf- oder Gus 2xr-Konstrukt trugen. Diese wurden durch Kreuzung von hemizygoten Pflanzen (zwei GUS-Kopien), die die GUS-Gene hoch exprimierten (Gus 2xf 117), oder homozygoten Linien (4 GUS-Kopien), die Silencing der GUS-Gene aufwiesen (Gus 2xf 108, Gus 2xf 109, Gus 2xf 119, Gus 2xr 123, Gus 2xr 125, Gus 2xr 126), mit *A. thaliana* Wildtyp erhalten. Die DNA dieser Linien wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert und die Methylierung des GUS-Gens mit *HpaII* untersucht. Lediglich in den Linien, die Nachkommen von für die T-DNA homozygoten Pflanzen waren, war Methylierung des GUS-Gens zu erkennen (Fragmente bei 716 und 741 bp, Abb. 23). In der Linie Gus 2xf 117 hemi dagegen ist keine Methylierung der GUS-Gene zu erkennen.

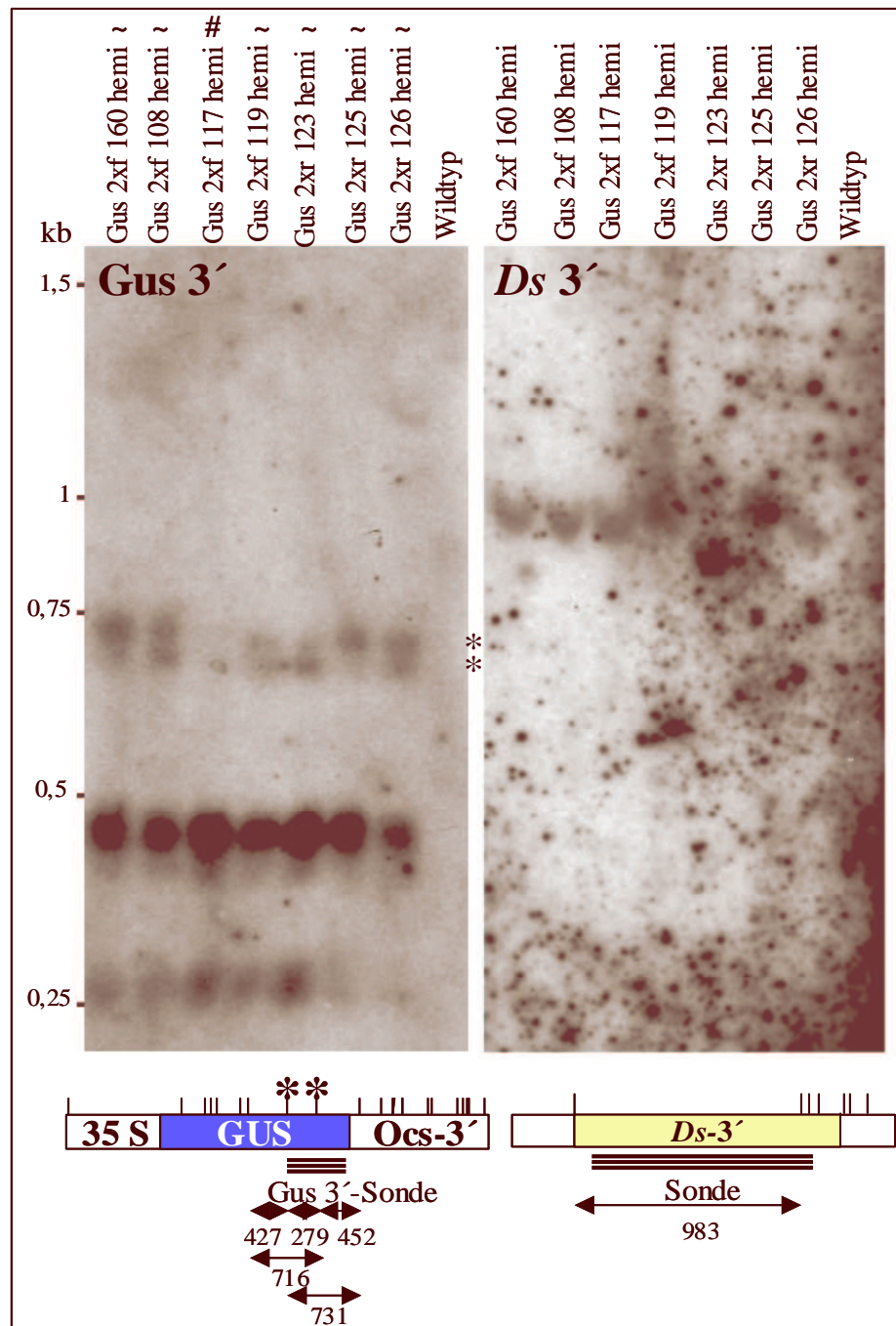


Abbildung 23: Methylierungsanalyse von für die T-DNA hemizygoten Linien, die Nachkommen von Pflanzen mit dem Gus 2xf- oder Gus 2xr-Konstrukt sind. Diese wurden durch Kreuzung von hemizygoten oder homozygoten Pflanzen mit *A. thaliana* Wildtyp erhalten. Genomische DNA von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit *HpaII* gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS 3'-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds*-3'-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens des Enzyms. Die Fragmente, die durch Methylierung von *HpaII*-Schnittstellen erhalten wurden, sind mit Sternen markiert. Eine Restriktionskarte mit den erhaltenen Fragmenten ist angegeben. ~ Nachkommen von für die T-DNA homozygoten Pflanzen; # Nachkommen von für die T-DNA hemizygoten Pflanzen.

Um Erklärungen für die Methylierung der GUS-Gene der Linie Gus 1xr 30 zu finden, wurde eine Methylierungsanalyse mit den Restriktionsenzymen *HpaII* und *AluI* von allen Linien, die die Gus 1xf- oder Gus 1xr-T-DNA homozygot trugen, durchgeführt (Gus 1xf 30, Gus 1xf 60, Gus 1xf 110, Gus 1xf 117, Gus 1xr 3, Gus 1xr 18, Gus 1xr 30, Gus 1xr 69, Gus 1xr 112, Gus 1xr 118 und Gus 1xr 127). Von den Linien Gus 1xr 30 und Gus 1xr 69 wurden Pflanzen zweier Generationen untersucht (T4 und T7 bzw. T4 und T8). Als Kontrolle diente DNA der Linie Gus 3xr 126, die 6 GUS-Kopien und daher Silencing aufwies. Die für die Analyse eingesetzte DNA wurde aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen isoliert. Wie in der Hybridisierung mit einer GUS-3'-Sonde zu erkennen ist, besaß neben der Kontrolle Gus 3xr 126 nur die Linie Gus 1xr 30 in beiden verschiedenen Generationen (trotz hoher GUS-Aktivität, Daten nicht gezeigt) Methylierung zweier *HpaII*-Schnittstellen in der codierenden Sequenz des GUS-Gens (Abb. 24). Die Hybridisierung der Membran mit der *Ds*-3'-Sonde zeigte vollständiges Schneiden der DNA.

Bei der Analyse mit *AluI* konnte nur Methylierung von *AluI*-Schnittstellen der DNA der Linie Gus 3xr 126 gefunden werden (Daten nicht gezeigt). *AluI* schneidet nicht, wenn das Cytosin in der Erkennungs-Sequenz 5'-AGCT-3' methyliert ist. Je nachdem, ob ein Guanin bzw. eine andere Base 3' folgt, liegt symmetrische CNG- bzw. asymmetrische Methylierung vor. Die *AluI*-Schnittstelle bei 2249 bp im GUS-Gen wäre daher symmetrisch, die bei 3032 bp dagegen asymmetrisch methyliert (siehe Restriktionskarte in Abb. 15). *HpaII* dagegen schneidet nicht bei Methylierung eines oder beider Cytosine in der Erkennungssequenz 5'-CCGG-3'. Da keine CNG-Methylierung mit *AluI* nachgewiesen wurde, kann vermutet werden, dass auch in den *HpaII*-Schnittstellen nur CG-Methylierung und keine CNG-Methylierung vorliegt. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass nur die CG-Methylierung vererbt wird.

Die Linie Gus 1xr 30 zeigte in unabhängigen Experimenten häufig die höchste GUS-Expression aller Linien, die eine Gus 1xf- oder Gus 1xr-T-DNA homozygot trugen (z. B. Abb. 11, 18). Da in dieser Arbeit Hinweise für die Erhöhung der Transkript-Menge über einen Schwellenwert als Auslöser von PTGS erbracht wurden, könnte die GUS-Expression in der Linie Gus 1xr 30 an diesem Schwellenwert liegen, was die Wahrscheinlichkeit von Silencing und damit Methylierung der GUS-Gene erhöhen sollte.

Wie die weiter oben aufgeführten Ergebnisse zeigen (Abb. 21, 23), wird Methylierung von hoch exprimierten GUS-Genen gefunden, wenn diese in Nachkommen von Pflanzen mit stillgelegten und daher methylierten GUS-Genen vorliegen. Ein Teil der Methylierung des GUS-Gens wird also trotz meiotischer Reversibilität des GUS-Silencings meiotisch vererbt.

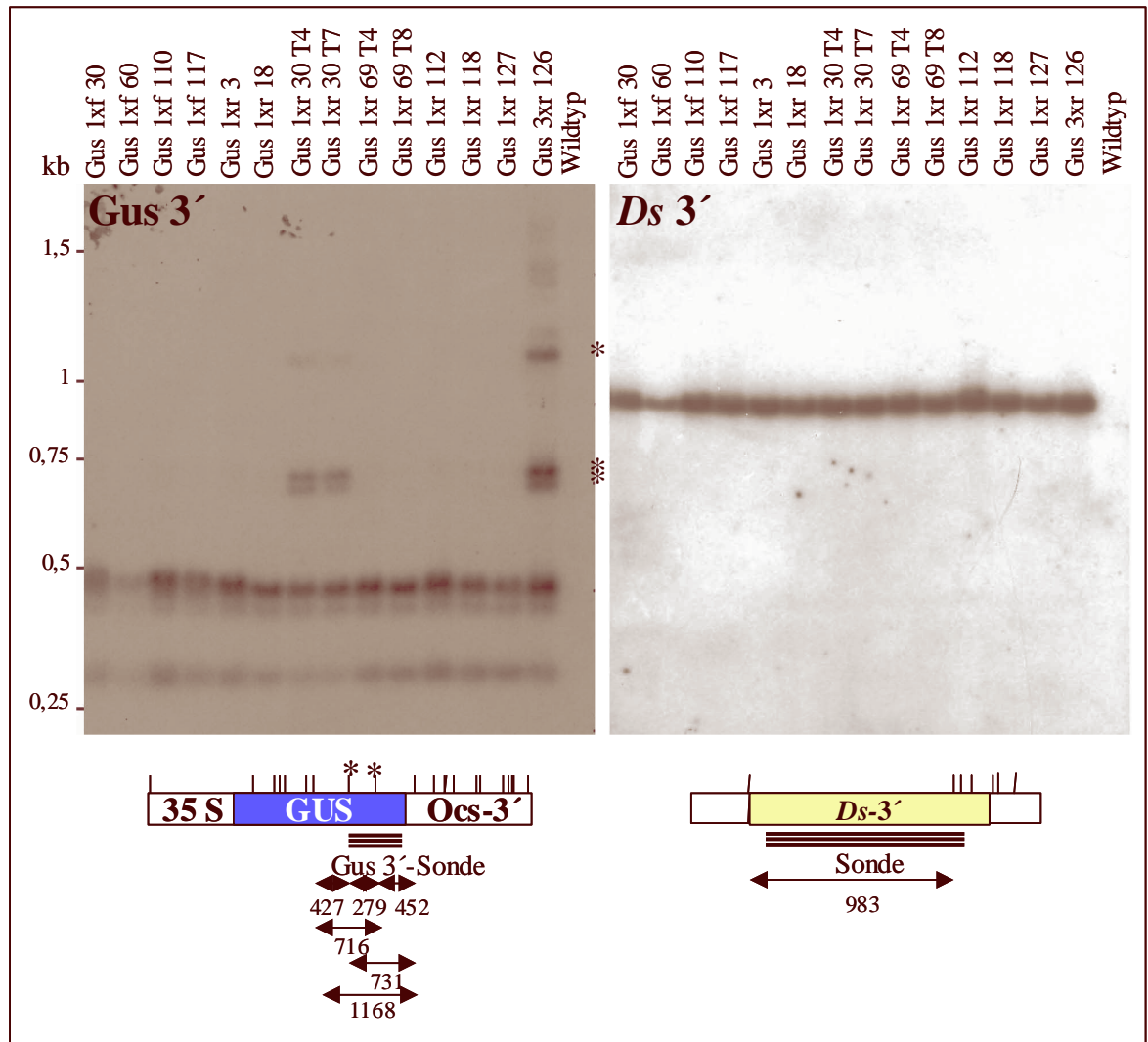


Abbildung 24: Methylierungsanalyse von Linien, die das Gus 1xf- oder Gus 1xr-Konstrukt homozygot tragen. Als Positivkontrolle wurde die Linie Gus 3xr 126 (für die T-DNA homozygot) verwendet. Genomische DNA von 8 Wochen alten Pflanzen wurde mit *HpaII* gespalten, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS3'-Sonde und nach Entfernen der Sonde mit einer *Ds*-3'-Sonde zur Überprüfung des vollständigen Schneidens des Enzyms. Die Fragmente, die durch Methylierung von *HpaII*-Schnittstellen erhalten wurden, sind mit Sternen markiert. Eine Restriktionskarte mit den erhaltenen Fragmenten ist angegeben. T4, T7 oder T8 gibt die Generation der untersuchten Pflanzen an.

Ob dies für die Linie Gus 1xr 30 auch zutrifft oder ob die festgestellte Methylierung bereits vor der Nachweisbarkeit von Silencing detektiert werden kann, kann nicht geklärt werden. Es wurde aber bereits Methylierung der GUS-Gene der Linie Gus 1xr 30 und der Nachkommen der Kreuzung Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69 in 2 Wochen alten Pflanzen festgestellt (Abb. 21). GUS-Silencing in Linien, die 2 Kopien der GUS-Gene trugen, wurde dagegen nur in Einzelfällen in 8 Wochen alten Pflanzen (3.3.7) und in noch selteneren Fällen in 2 Wochen alten Pflanzen beobachtet (Linie Gus 1xr 30, 1 von 500 getesteten Pflanzen; Gils

2000). Daher liegt es nahe, dass die Methylierung der GUS-Gene in der Linie Gus 1xr 30 und in Nachkommen der Kreuzung Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69 meiotisch vererbt wurde.

3.5.2 siRNAs und Methylierung der GUS-Gene

Um Erkenntnisse über den Zusammenhang von Methylierung, Expression der GUS-Gene und dem Auftreten von siRNAs zu gewinnen, wurde Gesamt-RNA aus Rosettenblättern von 8 Wochen alten Pflanzen, die hohe GUS-Expression von methylierten oder nicht methylierten GUS-Genen oder niedrige GUS-Expression von methylierten GUS-Genen aufwiesen, isoliert, um GUS-siRNAs und -mRNA nachzuweisen. Als Hybridisierungskontrolle und Größenstandard dienten Oligonukleotide, die spezifisch für das OCS-3'-Ende (OCS-F) oder das GUS-Gen (GusR) waren. 75 ng dieser Oligonukleotide wurden mit Wildtyp-RNA gemischt. In den Linien Gus 1xf 60/110 homo und Gus 1xr 30/69 homo, die Silencing der GUS-Gene aufwiesen, waren siRNAs nachzuweisen (Abb. 25). Alle anderen untersuchten Linien zeigten hohe GUS-Expression (Abb. 25). In allen Linien, die keine Methylierung des GUS-Gens aufwiesen (Abb. 25) (Gus 1xf 110 homo, Nachkommen der Kreuzung Gus 1xf 60 mit Gus 1xf 110, Gus 2xf 113 hemi) wurden keine siRNAs nachgewiesen. Ebenso sind keine siRNAs in Nachkommen der Kreuzungen Gus 1xf 60/110 mit Wildtyp, Gus 2xf 101 mit Wildtyp und Gus 2xf 110 mit Wildtyp zu erkennen (Abb. 25). Bei diesen wurde Methylierung der GUS-Gene, ebenso wie in Nachkommen der Kreuzung Gus 1xr 30 mit Gus 1xr 69, gefunden (Abb. 21). Bei letzterer kann allerdings in diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden, dass siRNAs vorliegen. Einige der Nachkommen dieser Kreuzung wiesen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Linien Silencing auf, wie semiquantitative GUS-Aktivitätstests zeigten (Daten nicht gezeigt). Es wurde zwar nur Blattmaterial von Pflanzen, die hohe GUS-Expression zeigten, geerntet, allerdings ist nicht auszuschließen, dass auch in diesen Pflanzen bereits Silencing ausgelöst wurde. In weiteren Analysen wurden keine GUS-siRNAs in RNA-Präparationen der Linie Gus 1xr 30 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), die trotz hoher GUS-Expression Methylierung des GUS-Gens aufwies (Abb. 24). Grundsätzlich ist zu bedenken, dass die Nicht-Detektion von siRNAs nicht bedeuten muss, dass diese nicht vorhanden sind, weil die Menge der siRNAs möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Methylierung der codierenden Sequenz nicht in allen Fällen mit PTGS korreliert. Bei Linien, die hohe Expression des GUS-Gens trotz Methylierung der transkribierten Sequenz aufwiesen, wurden keine oder nur geringe Mengen siRNAs im Gegensatz zu Linien mit inaktivierten GUS-Genen (größere Mengen siRNAs) nachgewiesen.

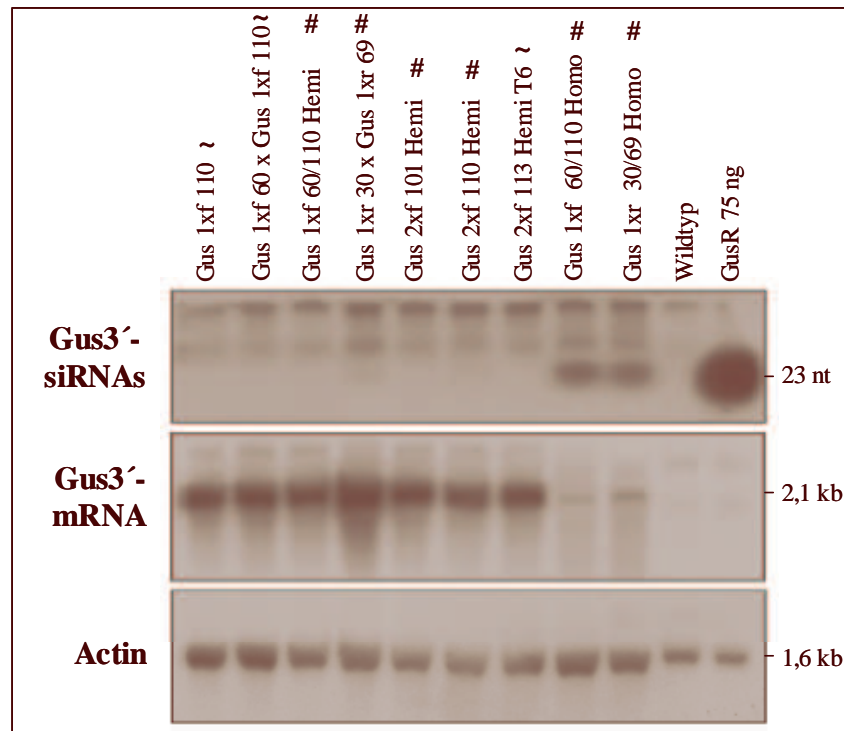


Abbildung 25: Untersuchung von siRNAs in Linien, die Methylierung der GUS-Gene aufwiesen. Es wurde ein Teil der in den Abbildungen 21 und 22 aufgeführten Linien untersucht. Gesamt-RNA wurde aus 8 Wochen alten Pflanzen isoliert und in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Das Gelstück mit RNAs unterhalb einer Größe von 200 Basen wurde abgetrennt, und diese RNAs wurden auf eine Membran transferiert. Die Polung der Gelkammer wurde vertauscht und so größere RNAs aufgetrennt. Diese wurden ebenfalls auf eine Membran transferiert. Erstere Membran wurde mit einer Gus3'-Sonde (siehe Abb. 24) bei 42 °C hybridisiert, letztere ebenfalls mit einer Gus3'-Sonde, aber bei 58 °C. Die geringe Hybridisierungstemperatur für die Membran mit den niedermolekularen RNAs führte zu unspezifischen Hybridisierungen mit RNAs im höhermolekularen Bereich als die siRNAs. Nach Entfernen der Sonde wurde die Membran mit hochmolekularen RNAs mit einer Actin-Sonde zur Standardisierung der Ladung der RNAs hybridisiert. Als Größenstandard und Hybridisierungskontrolle wurden 75 ng des GusR-Oligonukleotids, gemischt mit Wildtyp-RNA, aufgetragen. ~ Pflanzen wiesen keine Methylierung der GUS-Gene auf, # Pflanzen wiesen Methylierung der GUS-Gene auf (Abb. 21).

3.6 Der Einfluss genetischer Modifikatoren auf posttranskriptionell stillgelegte GUS-Gene

Im Rahmen der umfangreichen Untersuchungen zu posttranskriptionellem Silencing in *C. elegans*, *D. melanogaster*, *N. crassa* und verschiedenen Pflanzenspezies konnte eine Reihe von genetischen Modifikatoren von PTGS identifiziert werden (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001). Der Mechanismus von PTGS und die beteiligten Gene bzw. Proteine sind in den verschiedenen Arten zum Teil konserviert. Es sollten durch reverse Genetik T-DNA-Insertionen in *Arabidopsis* Genen identifiziert werden, die Homologie zu Modifikatoren von PTGS in anderen Organismen aufwiesen.

Das erste Gen, von dem eine Beteiligung an PTGS nachgewiesen werden konnte, wurde in *N. crassa* identifiziert (Cogoni und Macino 1999a). Es wies Homologie zu einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) auf, die aus *L. esculentum* isoliert worden war (Schiebel *et al.* 1998). In *C. elegans* und *A. thaliana* konnte für ein homologes Protein ebenfalls eine bedeutende Rolle bei PTGS gezeigt werden (Smardon *et al.* 2000, Dalmay *et al.* 2000, Mourrain *et al.* 2000). Aufgrund der nahezu vollständigen Sequenzierung und Annotierung des *A. thaliana* Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) konnten 5 weitere Homologe dieses Proteins in *A. thaliana* identifiziert werden (Mourrain *et al.* 2000). Für das Gen auf BAC T22B4 (Chromosom IV, Akzessionsnr. At4g11130) wurde als einziges der RdRP-Gene ein „expressed sequence tag“ (EST) gefunden, der Expression des Gens beweist. Daher wurde versucht, mittels reverser Genetik eine T-DNA-Insertion in diesem Gen zu identifizieren. Auf DNA-Pools von jeweils 1000 Pflanzen, die unabhängige T-DNA-Insertionen enthielten, wurden PCR-Reaktionen mit Gen-spezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und diese mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. In der Abbildung 26a ist ein Teil der PCR-Produkte zur Suche einer Insertion im Gen der RdRP auf BAC T22B4 gezeigt. Wurde ein Fragment für einen Pool nachgewiesen, so wurden weitere PCR-Analysen auf Subpools des identifizierten 1000er Pools durchgeführt. Erstere enthielten DNAs von jeweils 100 unabhängigen T-DNA Linien. Wurde ein PCR-Produkt erhalten, wurde es sequenziert, falls die DNA-Menge ausreichend war, um zu bestätigen, dass tatsächlich eine T-DNA-Insertion in dem Gen vorlag. Weitere PCR-Reaktionen wurden auf Subpools durchgeführt, die DNAs von jeweils 10 unabhängigen T-DNA-Linien enthielten. Nach der Identifikation eines 10er Pools konnten anhand von PCR Einzelpflanzen auf Insertion der T-DNA im RdRP-Gen überprüft werden. Auf diese Weise konnte eine T-DNA Insertion im 2. Exon der RdRP auf BAC T22B4 identifiziert werden (Abb. 26b). Durch PCR- und Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass eine vollständige T-DNA integriert ist. Ebenso konnten für die T-DNA homozygote Pflanzen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die T-DNA ist ein Derivat des Vektors pD991 (Campisi *et al.* 1999) und enthält unter anderem ein GUS-Gen unter der Kontrolle des minimalen 35S Promotors. GUS-Aktivität konnte allerdings in diesen Pflanzen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Unter den untersuchten Langtag- oder Kurztagbedingungen konnte kein Phänotyp in für die T-DNA homozygoten Pflanzen beobachtet werden. Es wurden noch keine Experimente durchgeführt, die zeigen konnten, dass die T-DNA-Insertion zu einer Ausschaltung des Gens führte.

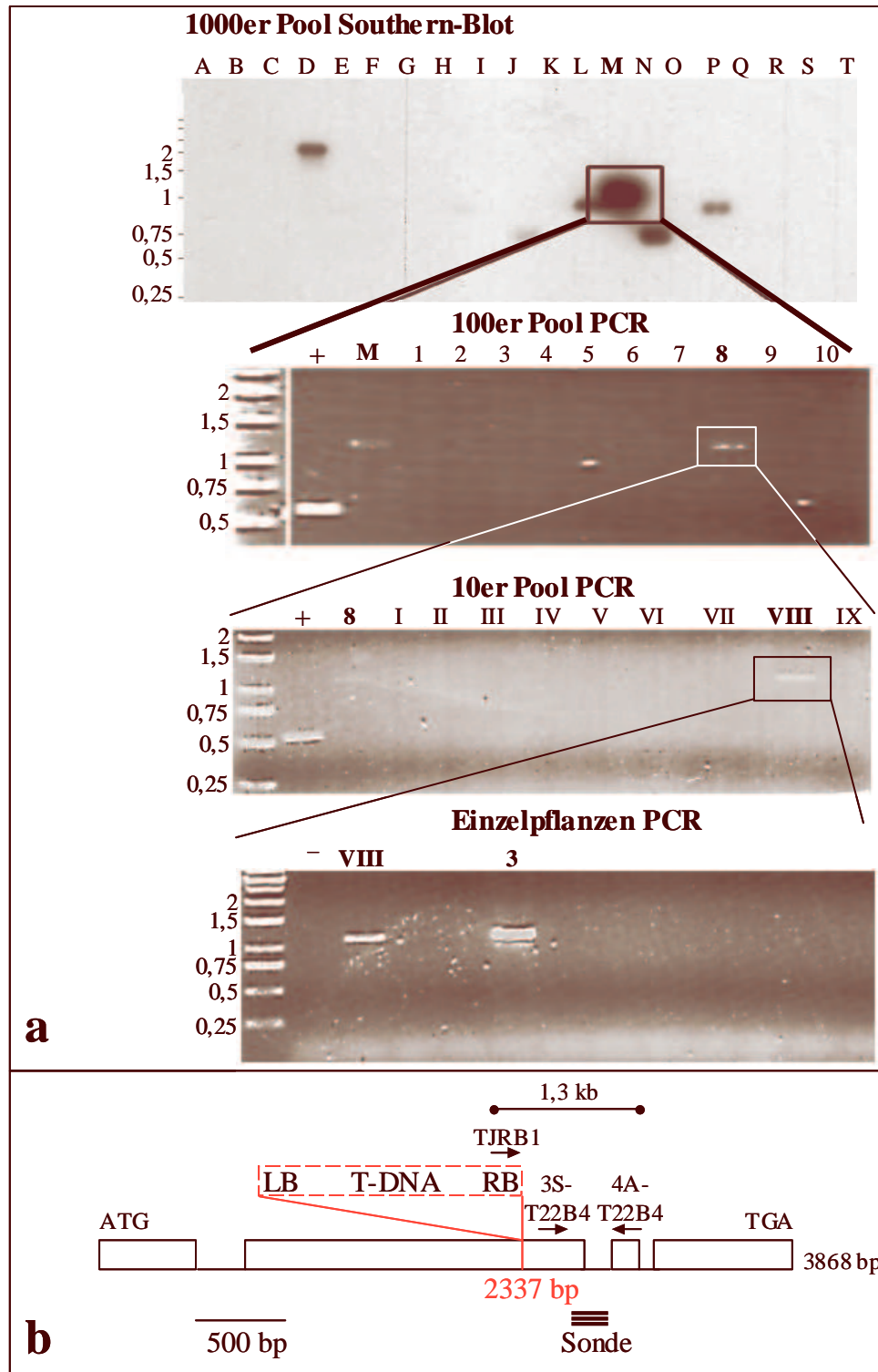


Abbildung 26: Identifizierung einer T-DNA-Insertion in einem Gen, das vermutlich für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert (At4g11130) **a**) Die PCR-Reaktionen wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Reaktionen auf den 1000er Pools wurden nach der Auftrennung auf eine Membran transferiert und diese mit einer Sonde hybridisiert (siehe **b**). Die Identifizierung einer Insertion gelang mit den Oligonukleotiden TJRB1 und T22B4-4A (siehe **b**). Positivkontrollen (+) wurden mit den Oligonukleotiden 3S-T22B4 und 4A-T22B4 durchgeführt. **b**) Annotierte Genstruktur und T-DNA-Insertion. Kästchen geben Exons, Linien Introns an. Die Größe der annotierten transkribierten Sequenz ist aufgeführt. Verwendete Oligonukleotide, Sonden und die T-DNA-Integration sind eingezeichnet. Die Oligonukleotide und die T-DNA sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Um eine mögliche Beteiligung der RdRP auf BAC T22B4 an PTGS nachzuweisen, wurden Pflanzen, die die T-DNA Insertion homozygot trugen, mit Pflanzen gekreuzt, die die T-DNAs der Linien Gus 2xf 110 oder Gus 3xr 126 homozygot trugen. In der F2 wurden durch PCR und Southern-Blot-Analysen Pflanzen identifiziert, die die T-DNA-Insertion in der RdRP homozygot und das Gus 2xf- oder Gus 3xr-Konstrukt hemi- oder homozygot trugen (Daten nicht gezeigt).

Von diesen Pflanzen wurden semiquantitative und quantitative GUS-Aktivitätstests durchgeführt. In Abbildung 27 sind semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 8 Wochen alten F3-Pflanzen, die die Insertion in der RdRP und die Gus 3xr 126-T-DNA homozygot trugen, dargestellt. Es wurden in der F2 drei unabhängige Linien, die beide T-DNAs homozygot trugen, identifiziert. Zusätzlich sind die GUS-Aktivitätstests von 8 Wochen alten F2-Pflanzen, die die Insertion in der RdRP homozygot und die Gus 2xf 110-T-DNA hemi- oder homozygot trugen (jeweils drei unabhängig identifizierte Pflanzen), zu erkennen. Als Kontrolle wurden für die T-DNA homozygote Nachkommen der Linie Gus 3xr 126 verwendet.

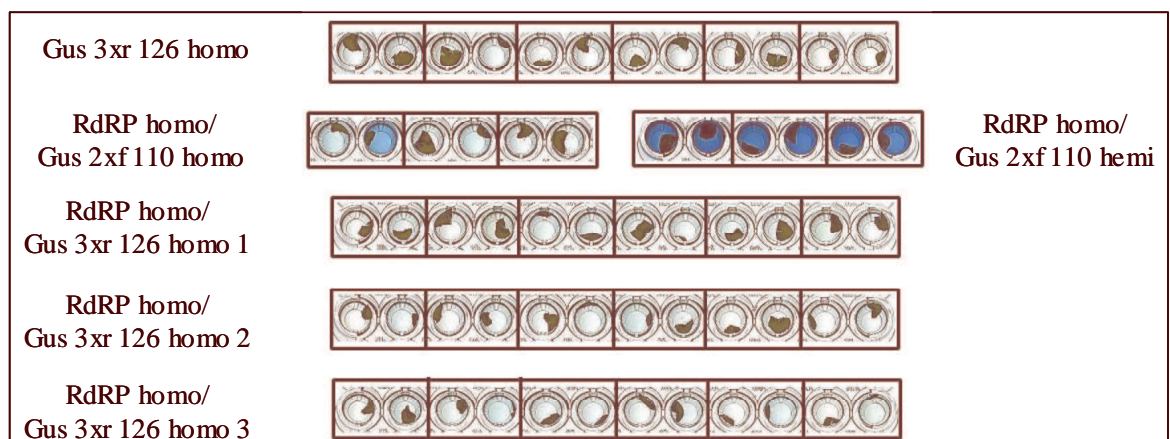


Abbildung 27: Repräsentative, semiquantitative GUS-Aktivitätstests von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen, die eine T-DNA-Insertion in einer annotierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase (At4g11130) und GUS-2xf- oder Gus 3xr-T-DNAs enthielten. Es wurden jeweils 2 Blätter einer Pflanze über Nacht bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. homo: T-DNA liegt homozygot vor, hemi: T-DNA liegt hemizygot vor. Es wurden Nachkommen von drei unabhängig identifizierten Pflanzen untersucht, die die Insertion in der RdRP homozygot und die Gus 3xr-T-DNA homozygot trugen (je 6 Pflanzen). Von Linien, die die T-DNA im RdRP-Gen homozygot und die Gus 2xf 110-T-DNA hemi- oder homozygot trugen, sind nur die Aktivitätstests von drei Pflanzen dargestellt.

Bei den Linien, die 4 oder 6 Kopien des GUS-Gens enthielten, war Silencing der GUS-Gene zu erkennen. Bei den Pflanzen, die zwei Kopien der GUS-Gene aufwiesen, war hohe Expression der GUS-Gene nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine wahrscheinliche Ausschaltung der RdRP auf BAC T22B4 keine Reaktivierung posttranskriptionell stillgelegter GUS-Gene, aber auch kein Auslösen von Silencing bewirkte. Erste Untersu-

chungen zur Methylierung der GUS-Gene in Linien, die eine Insertion im Gen der RdRP und eine Gus 3xr-T-DNA homozygot tragen, zeigten allerdings erste Hinweise auf stärkere Methylierung der GUS-Gene als in Linien, die nur eine Gus 3xr-T-DNA homozygot trugen (Daten nicht gezeigt). Es müssen aber noch weitere Analysen, z. B. zu siRNAs, in diesen Linien vorgenommen werden.

Eins der ersten Proteine aus *C. elegans*, für das eine Beteiligung an PTGS gezeigt werden konnte, war ein Homolog der in *Homo sapiens* identifizierten Werner-Syndrom-DNA-Helicase (Ketting *et al.* 1999). Dieses Protein weist sowohl RNase- als auch DNA-Helicase-Aktivität auf. In *A. thaliana* ist kein homologes Protein bekannt, das beide Aktivitäten besitzt, allerdings wurde für eine homologe RNase (At4g13870) und eine DNA-Helicase (At1g31360) eine Interaktion beider Proteine in einem Zwei-Hybrid-Experiment in *S. cerevisiae* gezeigt (Hartung *et al.* 2000). Möglicherweise werden die Aktivitäten, die die Proteine aus *C. elegans* bzw. *H. sapiens* besitzen, von zwei verschiedenen Proteinen in *A. thaliana* ausgeführt. Daher wurde nach T-DNA-Insertionen in diesen Genen mit Hilfe von reverser Genetik analog der oben beschriebenen Vorgehensweise gesucht. Für die RNase konnte keine Insertion gefunden werden, für die Helicase allerdings wurde eine T-DNA-Insertion im 13. Intron identifiziert (Abb. 28). Die T-DNA ist ein Derivat von pMOG553 (Goddijn *et al.* 1993). PCR-Analysen zeigten, dass an der Insertionsstelle zwei T-DNAs in invertierter Orientierung mit den RBs im Zentrum vorlagen (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von PCR konnten für die T-DNAs homozygote Pflanzen identifiziert werden, die unter den gewählten Langtag- bzw. Kurztagbedingungen keinen Phänotypen aufwiesen. Es wurden noch keine Experimente durchgeführt, die bewiesen, dass die Insertion zu einer Ausschaltung des Gens führte. Weiterhin muss getestet werden, ob die isolierte Mutante die Expression von Linien beeinflusst, die Silencing der SPT- oder GUS-Gene aufweisen.

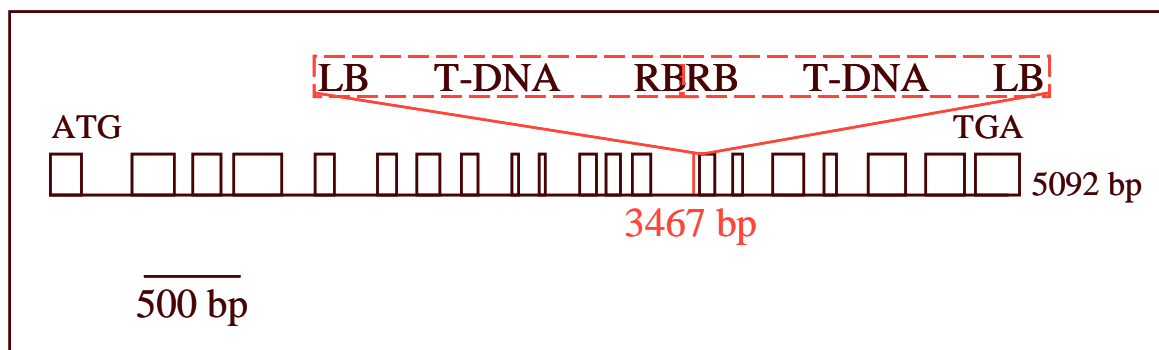


Abbildung 28: Genstruktur der annotierten DNA-Helicase At1g31360 und Insertion zweier T-DNAs, die invertiert zueinander vorliegen. Kästchen geben Exons, Linien Introns an. Die T-DNAs sind im 13. Intron integriert.

4 Diskussion

4.1 Verwendete T-DNA-Konstrukte, Stabilität der Konstrukte und transgene *A. thaliana* Linien

Alle verwendeten T-DNA-Konstrukte lagen bereits zu Beginn der Arbeit vor (Abb. 1; Bahadur unveröffentlicht, Gils 2000, Schubert 1999). Umfangreiche Analysen zur Stabilität der Konstrukte hatten gezeigt, dass Konstrukte, die tandemartig organisierte Reportergene enthielten, Rekombination in *A. tumefaciens* aufweisen können, die zum Verlust einer oder mehrerer Kopien führten (Schubert 1999). Die Analyse der transgenen *A. thaliana* Pflanzen in mehreren aufeinanderfolgenden Generationen ergab dagegen keine Evidenzen für derartige Rekombinationsphänomene. Generell wird Rekombination homologer Sequenzen an einem Locus sehr selten in Pflanzen gefunden (Assaad und Signer 1992). Abiotischer oder biotischer Stress führen allerdings zu erhöhten somatischen Rekombinationsraten (Lucht *et al.* 2002). Transgene Pflanzen, bei denen rekombinierte T-DNA-Konstrukte verbunden mit Verlust von einer oder zwei Kopien der Reportergencassetten festgestellt worden waren, waren vermutlich bereits mit rekombinierten T-DNA-Vektoren transformiert worden. Diese Linien wurden sowohl in *A. thaliana* als auch in *N. tabacum* identifiziert (3.4.1). Da diese transgenen Pflanzen eine vergleichbare Reportergenexpression wie Linien, die mit Konstrukten der entsprechend geringeren Reportergenkopienzahlen transformiert worden waren, aufwiesen, wurden sie auch für die Expressionsanalyse eingesetzt.

Auch der Großteil der für die Expressionsanalyse verwendeten transgenen *A. thaliana* Linien (57 von 66 Linien) lag bereits zu Beginn der Arbeit vor (Gils 2000, Schubert 1999). Der Integrationsort der T-DNA der meisten Linien (45 von 54 kartierten T-DNAs) war bereits in vorhergehenden Untersuchungen ermittelt worden (Forsbach 2001, Gils 2000, Schubert 1999).

4.2 Verringerte Transmission des Transformationsmarkers beruht auf Mutationen in essentiellen Genen

Bereits in vorangegangenen Analysen wurden drei Linien beschrieben, die aberrante Segregationen auf Kanamycin-haltigem Medium aufwiesen (Schubert 1999). Segregationen wurden als aberrant bezeichnet, wenn signifikant geringere als 3:1 Segregationen von resistenten zu sensitiven Keimlingen auf Kanamycin-haltigem Medium in unabhängigen Nachkommen einer Linie gefunden wurden. Diese Verteilungen entsprachen nicht den Mendel'schen Regeln. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Linien, die eine 2:1 (4 Linien), 1:1 bis 2:1 (3 Linien), 1:1 (4 Linien) und kleinere als 1:1 (11 Linien) Segregation

zeigten, identifiziert werden (Tab. 2). Diese transgenen Linien enthielten z.T. auch in dieser Arbeit nicht verwendete Konstrukte und Reportergene, aber alle ein NPT-Gen als Transformationsmarker. Bei keiner dieser Linien konnten für die T-DNA homozygote Pflanzen identifiziert werden.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden alle Transformanten auf eine aberrante Segregation untersucht. 9 von 426 unabhängigen Linien wiesen aberrante Segregationen auf (2,1 %). Es wurde ein Einfluss der genomischen Umgebung auf die Expression des NPT-Gens vermutet (Schubert 1999), wie er in *Drosophila* gezeigt werden konnte (zusammengefasst in Karpen 1994). In einigen Untersuchungen von Transgenpopulationen in Pflanzen wurde Silencing von Antibiotika-Resistenzgenen berichtet, das zu einer verringerten Transmission des Transformationsmarkers führte (Matzke *et al.* 1989, Mittelsten-Scheid *et al.* 1991). Nicht nur Silencing-Phänomene, sondern auch durch Insertion von T-DNAs in essentiellen Genen verursachte Mutationen können zu verringerter Transmission der T-DNA führen (Howden *et al.* 1998, Bonhomme *et al.* 1998, Feldmann *et al.* 1997).

Wie die morphologische Analyse der Samen in geöffneten Schoten zeigte, wiesen alle Linien mit einer aberranten Segregation der T-DNA abortive Samen auf, was auf einen Embryo- oder gametophytisch letalen Phänotypen hindeutet (Abb. 2). Von einer Embryo-letalen Mutation kann man bei einer 2:1 Segregation ausgehen. Für gametophytisch letale Mutationen werden Segregationen von 1:1 oder kleiner als 1:1 beobachtet. Die ermittelten Frequenzen für vermutlich gametophytisch letale Mutationen (6 von 426 Transformanten, 1,4%) sind vergleichbar mit den in anderen Untersuchungen gefundenen Werten in T-DNA-Populationen (2 %, Feldmann *et al.* 1997; 1,3 %, Bonhomme *et al.* 1998; 0,8 % Howden *et al.* 1998).

Die Bestimmung der flankierenden genomischen Sequenzen der T-DNAs offenbarte für 17 Linien eine Integration der T-DNA in annotierten Genen oder in wahrscheinlichen 5'-untranslatierten Bereichen oder Promotorbereichen von Genen. Bei 4 Linien wurden keine Integrationen der T-DNA in einem Gen, sondern in intergenischen Bereichen gefunden. Der Embryo- oder gametophytisch letale Phänotyp könnte in diesen Linien nicht durch die Insertion der T-DNA, für die die flankierende Sequenz ermittelt wurde, hervorgerufen worden sein, sondern durch eine andere T-DNA (z.T. lagen multiple T-DNA-Insertionen vor) verursacht sein. Weiterhin könnte das betroffene Gen nicht annotiert sein oder eine Insertion in einem nicht charakterisierten regulatorischen Bereich eines Gens vorliegen. Es wurden auch Fälle beschrieben, bei denen zu den T-DNAs ungekoppelte Mutationen vorlagen (zusammengefasst in Azpiroz-Leehan und Feldmann 1997). Bei allen anderen ermittelten Insertionen kann ebenfalls nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Mutation T-DNA induziert ist, da keine Komplementationen

oder vergleichbare Analysen durchgeführt wurden. Bei einigen betroffenen Genen allerdings kann eine wichtige Funktion im Zellstoffwechsel nahegelegt werden (z.B. UMP Synthase, Linie Spt 3xf 110 (Nasr *et al.* 1994); vakuoläre H⁺-ATPase Untereinheit A, Linie ΔGus 2a 141 (Aviezer-Hagai *et al.* 2000)). Zwei Mutationen waren Allele von bereits beschriebenen Embryo-letalen (Gus 3xr 136: *schlepperless* (Apuya *et al.* 2001)) oder gametophytisch letalen (Spt 3xr 129: *geminipollen* (D. Twell, pers. Mitteilung)) Mutationen.

Reziproke Kreuzungen mit *A. thaliana* Wildtyp zeigten, dass in den meisten Linien mit aberranten Segregationen eine verringerte Transmission der T-DNA durch beide Gametophyten erfolgte. Einige Linien wiesen einen vollständig paternal oder maternal letalen Phänotypen auf. Auch in anderen Studien zu gametophytisch letalen Mutationen wurde für die meisten Mutanten eine verringerte Transmission der T-DNA durch beide Gametophyten beschrieben (Howden *et al.* 1998, Bonhomme *et al.* 1998, Feldmann *et al.* 1997).

Verringerte oder verhinderte Transmission kann beispielsweise mit dem epigenetischen Phänomen genomische Prägung im Zusammenhang stehen. In *A. thaliana* wurde eine Mutation in einem Gen (*medea*) beschrieben (Grossniklaus *et al.* 1998), bei der die verhinderte Transmission durch den maternalen Gametophyten auf genomische Prägung zurückzuführen war (Vielle-Calzada *et al.* 1999). In diesen Pflanzen war die Entwicklung des Gametophyten nicht gestört. Allerdings war die maternal vererbte Kopie des Gens im Embryo und Endosperm epigenetisch inaktiviert, so dass eine Mutation der paternal vererbten Kopie zu nicht lebensfähigen Embryos führte. Ähnliche Mechanismen könnten bei einigen der in dieser Arbeit identifizierten Linien vorliegen.

Die genaue Analyse von Embryo- oder gametophytisch letalen Mutationen und die Bestimmung der betroffenen Gene bietet interessante Möglichkeiten, weil Insertionen in diesen Genen aufgrund der geringen Transmission der T-DNA in vielen Insertionspopulationen unterrepräsentiert sind. Grundsätzlich ermöglicht die Analyse Erkenntnisse über die Entwicklung der Gametophyten und des Embryos.

Bei allen untersuchten Linien einer repräsentativen Transgen-Population konnte gezeigt werden, dass die verringerten Transmissionen der T-DNA nicht auf epigenetische Inaktivierung des NPT-Gens, sondern auf Mutationen in essentiellen Genen zurückzuführen sind. Zumindest einige dieser Mutationen sind vermutlich durch Insertion der T-DNA bedingt.

4.3 Analyse der Reportergenexpression in *A. thaliana*

Für die Analyse der Reportergenexpression wurden lediglich Linien eingesetzt, die nur eine Kopie der T-DNA aufwiesen (3.2.1., bis auf die Linien mit zwei zueinander invertiert vorliegender T-DNAs). Daher war die Anzahl der Reportergene allein durch die Kopien-

zahl der Reportergene auf der T-DNA bestimmt. Die verwendeten T-DNAs enthielten ein bis drei Kopien des Streptomycinphosphotransferase (SPT)- oder β -Glucuronidase (GUS)-Gens, jeweils unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Je nachdem, ob die T-DNAs hemi- oder homozygot vorlagen, enthielten die Linien ein bis 6 Kopien der Reportergene. Höhere Kopienzahlen der Reportergene wurden durch Kreuzungen erhalten.

4.3.1 Stabile und hohe Expression von Reportergenen mit geringer Kopienzahl

Die Analyse der SPT-Expression in 8 Linien, die eine Spt 1xf- oder Spt 1xr-T-DNA homozygot, also zwei SPT-Kopien trugen, zeigte eine vergleichbare Expression in allen unabhängigen Transformanten (3.3.1). Die Expression war stabil im Laufe der Pflanzenentwicklung und in allen untersuchten Generationen. Ausnahmslos hohe und stabile Expression der SPT-Gene wurde auch bei unabhängigen Transformanten, die 4 (10 Linien) oder 6 SPT-Kopien (7 Linien) trugen, nachgewiesen. Die SPT-Expression variierte bei Linien mit gleichen SPT-Kopienzahlen nur geringfügig (3.3.1, 3.3.2).

Die Bestimmung der die T-DNAs flankierenden genomischen Bereiche zeigte eine Verteilung der T-DNA-Insertionen auf alle 5 *Arabidopsis* Chromosomen (25 Linien, 18 davon kartiert) (3.3.1).

Stabile und hohe Expression wurde auch in transgenen Linien gefunden, die zwei GUS-Kopien (Forsbach 2001, Gils 2000, Lechtenberg 1999, Schubert 1999) oder zwei GFP-Kopien enthielten (Forsbach 2001, Lechtenberg unveröffentlicht). Weiterführende Experimente in dieser Arbeit zeigten, dass zwei Kopien des GUS-Gens unabhängig von der Konstellation der GUS-Gene (T-DNA mit einer GUS-Kopie homozygot, zwei GUS-Kopien an unterschiedlichen Loci im *A. thaliana* Genom, zwei GUS-Kopien in Tandem auf einer T-DNA) hohe GUS-Expression verliehen (3.3.7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Integrationsort einer T-DNA nur einen geringen Einfluss auf die Expression eines auf der T-DNA befindlichen Transgens unter der Kontrolle eines starken Promotors hat. Der in *Drosophila* beschriebene (zusammengefasst in Karpen 1994) und für transgene Pflanzen postulierte (zusammengefasst in Flavell 1994) sogenannte Positionseffekt spielt daher in *Arabidopsis* T-DNA Transformanten keine oder nur eine sehr geringe Rolle. Die Integration eines niedrig exprimierten Transgens in der Nähe eines starken pflanzlichen Promotors oder *Enhancers* kann die Expression des Transgens allerdings erhöhen, wie Untersuchungen mit „Promoter- oder Enhancer-Trap“-T-DNAs zeigen (z.B. Topping *et al.* 1994, Klimyuk *et al.* 1995). Diese Einflüsse sind allerdings nicht epigenetischer Natur. In einer Untersuchung von Gils (2000) konnten Hinweise auf einen Positionseffekt in *A. thaliana* erbracht werden. Es wurde die Expression von Reportergenen untersucht, die durch Transposition in viele verschiedene Genompositionen eingebracht worden

waren. Die Frequenz der Linien, bei denen die Expression des Reportergens vermutlich durch den Einfluss des Integrationsortes verringert war, war allerdings sehr gering.

Eine Verwendung von T-DNAs ist möglicherweise nicht für eine Analyse von Positionseffekten geeignet, weil T-DNA-Integrationen in *A. thaliana* präferentiell in transkribierten Bereichen des Genoms gefunden werden (zusammengefasst in Tinland 1996) und in Bereichen mit geringer Gen-Dichte wie den Centromerregionen unterrepräsentiert sind (Forsbach 2001). Positionseffekte würden sich vermutlich auch auf den Transformationsmarker der T-DNA auswirken. Eine vollständige Inaktivierung würde die Identifikation solcher Transformanten mit Selektionsexperimenten unmöglich machen.

In den hier vorgestellten Analysen wurde die häufig bei Transgen-Populationen in Pflanzen beobachtete große Variabilität der Expression zwischen unabhängigen Transformanten (z.B. Holtorf *et al.* 1995, Napoli *et al.* 1990, Rouwendal *et al.* 1997) nicht gefunden. In diesen Studien wurde jedoch entweder keine oder nur eine ungenaue Analyse der T-DNA Kopienzahl und Organisation durchgeführt, während die hier gezeigten Daten ausschließlich anhand von Einzelkopie-Transformanten erarbeitet wurden. Daher lassen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen den Schluss zu, dass in Linien mit T-DNAs in Einzelkopie, die ein beliebiges Transgen tragen, die Wahrscheinlichkeit einer stabilen und einheitlich hohen Expression des Transgens in *Arabidopsis thaliana* erhöht ist.

Allerdings wurde eine Abschaltung der Gen-Expression auch in Linien gefunden, die nur eine Kopie eines GUS-Gens aufwiesen (Elmayan und Vaucheret 1996, Elmayan *et al.* 1998, Day *et al.* 2000). In den ersten beiden Analysen wurde allerdings ein doppelter 35S-Promotor verwendet, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten einfachen 35S-Promotor. In der letzteren Studien wurde das Transgen durch nackten DNA-Transfer eingebracht und Einzelkopielinien durch *cre-lox*-Rekombination erzeugt. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Verwendung starker Promotoren für die Expression eines Transgens und die Transformationsmethode bzw. das Vorliegen von großen DNA-Mengen des Transgens bei der Transformation einen negativen Einfluss auf die Transgenexpression haben können.

In einer Untersuchung in *Petunia*, die ein wesentlich komplexeres Genom als *A. thaliana* aufweist, wurde auch eine Abschaltung eines Transgens auf einer T-DNA in Einzelkopie berichtet (Pröls und Meyer 1992). Ein Einfluss der Genomstruktur in Pflanzen mit komplexeren Genomen als *A. thaliana* kann daher nicht ausgeschlossen werden.

4.3.2 Positive Korrelation zwischen der Kopienzahl von Reporter genen und ihrer Expression

Unabhängige transgene Pflanzen, die zwei, 4 oder 6 SPT-Kopien aufwiesen, zeigten eine positive Korrelation zwischen der Kopienzahl der SPT-Gene und ihrer Expression (3.3.2).

Die Expression war stabil innerhalb der Pflanzenentwicklung und in den untersuchten Generationen. Transgene Pflanzen, die ein oder zwei GUS- (Forsbach 2001, Gils 2000, Lechtenberg 1999, Schubert 1999) oder GFP-Gene (Forsbach 2001, Lechtenberg unveröffentlicht) enthielten, wiesen auch eine positive Korrelation zwischen Kopienzahl des Reportergens und seiner Expression auf. Diese Ergebnisse beweisen, dass jede Kopie eines der untersuchten Reportergene unabhängig von der Konfiguration gleich zur Gesamt-Expression des Reportergens beiträgt. Hinweise auf eine positive Korrelation zwischen der Kopienzahl eines GUS-Gens und seiner Expression wurden in Tabak erbracht (Hobbs *et al.* 1993). In *Drosophila* konnte für ein Alkoholdehydrogenase-Transgen eine positive Korrelation zwischen der Kopienzahl und der Expression des Transgens nachgewiesen werden (Pal-Bhadra *et al.* 2002).

4.3.3 T-DNAs, die als invertierte Sequenzwiederholungen zueinander vorliegen, haben keinen negativen Einfluss auf die Reporterexpression

Bei der Analyse der T-DNA-Transformanten mit SPT-Reportergenen wurden zwei Linien identifiziert, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung zueinander an einem Locus im *A. thaliana* Genom aufwiesen (Spt 1xr 88, Spt 3xf 159, 3.3.5, Abb. 9). Bei der Linie Spt 1xr 88 befand sich zwischen den T-DNAs ein Bereich nicht genauer charakterisierter DNA, der vermutlich auch invertiert vorlag. In für die T-DNA homozygoten Pflanzen wies diese Linie 4 SPT-Kopien auf. Weil die Linie Spt 3xf 159 eine vermutlich durch die Integration der T-DNA in einem Gen verursachte gametophytisch letale Mutation besaß (3.2.2), lag die T-DNA stets hemizygot vor. Also wies die Linie 6 SPT-Kopien auf. Beide Linien zeigten eine hohe, stabile Expression, vergleichbar mit der von anderen Linien mit 4 bzw. 6 SPT-Kopien (3.3.5). Trotz der möglichen Sekundärstrukturen von invertierten Sequenzwiederholungen wurde also kein Einfluss auf die Expression festgestellt. Bei Linien, die eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs mit einem GFP-Gen (eine Linie, Forsbach 2001) oder mit einem GUS-Gen (zwei Linien, Lechtenberg unveröffentlicht) aufwiesen, wurde auch hohe stabile Expression gefunden. In den Linien mit den GUS-Genen wurde nur in für die T-DNA hemizygoten Pflanzen (zwei GUS-Kopien) hohe Expression nachgewiesen. In den für die T-DNA homozygoten Linien (4 GUS-Kopien) wurde jedoch Silencing der GUS-Gene festgestellt (Lechtenberg unveröffentlicht). Dies ist allerdings auf die erhöhte Kopienzahl der GUS-Gene zurückzuführen (s.u.).

In vielen Analysen wurde die Beteiligung von invertierten Sequenzwiederholungen an Silencing nachgewiesen (Hobbs *et al.* 1993, Bender und Fink 1995, Stam *et al.* 1997, 1998, Jorgensen *et al.* 1996). Es wurde Paarung homologer DNA-Sequenzen als Auslöser der Inaktivierung vermutet (zusammengefasst in Selker 1999). Das durch invertierte Sequenzwiederholungen ausgelöste Silencing könnte auch dadurch erklärt werden, dass in den be-

obachteten Fällen Transkription der invertierten Sequenzwiederholung stattfindet und so doppelsträngige RNA entsteht. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Expression einer invertierten Sequenzwiederholung und die damit entstehende dsRNA effizient Silencing auslösen kann (Waterhouse *et al.* 1998, Mette *et al.* 1999, 2000, Chuang *et al.* 2000). Da die SPT-Gene der in dieser Arbeit identifizierten Linien mindestens 4 kb vom Zentrum der invertierten Sequenzwiederholung entfernt liegen, könnte eine mögliche Transkription des Zentrums der invertierten Sequenzwiederholung nicht bis zu den SPT-Genen fortlaufen, so dass keine SPT-dsRNA entsteht. Es wäre möglich, dass in den beschriebenen Fällen kryptische Promotoren für die Transkription verantwortlich sind, die möglicherweise in den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten nicht vorhanden sind. Es wurde nachgewiesen, dass das Zentrum einer invertierten Sequenzwiederholung besonders hoch methyliert ist (Stam *et al.* 1998). Die Verwendung der Methylierungs-sensitiven Enzyme *MvaI*, *PvuII* und *PstI* für die Analyse der invertierten Sequenzwiederholungen ergab allerdings keine Hinweise auf Methylierung im Zentrum der hier untersuchten invertierten Sequenzwiederholungen.

Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass die Struktur einer invertierten Sequenzwiederholung *per se* kein Silencing auslösen kann. Eine Paarung homologer DNA-Sequenzen bei invertierten Sequenzwiederholungen als Auslöser von Silencing wird mit den hier vorgestellten Ergebnissen unwahrscheinlich gemacht.

4.3.4 Posttranskriptionelles Gen-Silencing bei erhöhter Kopienzahl von Reporter-genen durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen vermutlich Gen-spezifischen Schwellenwert

Vorausgegangene Analysen hatten gezeigt, dass Silencing von GUS-Genen, die unter der Kontrolle des 35S-Promotors stehen, bei drei oder mehr Kopien beobachtet wird. Es besteht also eine negative Korrelation zwischen Kopienzahl der GUS-Gene und ihrer Expression ab drei Kopien, im Gegensatz zur positiven Korrelation bei bis zu zwei Kopien (Gils 2000, Schubert 1999). Da in den untersuchten Linien die drei GUS-Gene in einer repetitiven Organisation vorlagen, konnte nicht geklärt werden, ob die tandemartige Konfiguration der Gene oder die Erhöhung der Transkriptmenge, bedingt durch höhere Kopienzahl, Silencing auslösen. Daher wurden durch Kreuzungen Linien erzeugt, die drei GUS-Kopien an verschiedenen Loci im *A. thaliana* Genom enthielten. Es wurde Silencing aller drei GUS-Gene festgestellt. Da jede Kopie alleine hohe GUS-Expression vermittelt (3.3.7, 3.3.8), können durch das Konstrukt bedingte Effekte wie die Produktion von *antisense* RNA als Auslöser des Silencings ausgeschlossen werden. In anderen Analysen wurde gezeigt, dass das Vorliegen multipler 35S Promotoren und durch diese vermittelte hohe Transkription verschiedener Gene kein Silencing verursacht (Lechtenberg 1999). Transgene Pflanzen, die drei SPT-Gene oder zwei GUS-Gene unter dem 35S Promotor in repetiti-

ver Anordnung auf der T-DNA besaßen, wiesen ebenfalls hohe Expression der SPT- bzw. GUS-Gene auf (3.3.1, 3.3.7). Promotorhomologie als Auslöser des Silencings kann damit auch ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurden Kreuzungen von Linien, die ein promotorloses und daher nicht exprimiertes GUS-Gen enthielten, mit Linien, die 2 Kopien der GUS-Gene unter der Kontrolle des 35S Promotors aufwiesen, durchgeführt. Die für beide Loci hemizygoten Nachkommen zeigten stabile und hohe GUS-Expression, vergleichbar mit der von Linien, die nur zwei exprimierte GUS-Kopien besaßen (3.3.8, Forsbach 2001). Alle diese Ergebnisse zusammengenommen beweisen, dass das Silencing durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst wird.

Da meiotische Reversibilität und Zunahme des Silencings im Laufe der Pflanzenentwicklung gefunden wurden, wurde ein posttranskriptioneller Mechanismus des Silencings vorgeschlagen (Schubert 1999), weil diese Merkmale nur bei PTGS gefunden werden (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). In dieser Arbeit konnten weitere Hinweise erbracht werden, dass das Silencing der GUS-Gene posttranskriptionell geschieht (3.3.9). siRNAs mit Homologie zur transkribierten Sequenz eines inaktivierten Gens werden nur bei PTGS gefunden (Hamilton und Baulcombe 1999). In dieser Arbeit konnten siRNAs der transkribierten Sequenz des GUS-Gens in Linien, die Silencing der GUS-Gene aufwiesen, nachgewiesen werden. Methylierungsanalysen der GUS-Gene zeigten weiterhin, dass inaktivierte GUS-Gene symmetrische (CG- und CNG-) und asymmetrische Methylierung der transkribierten Sequenz des GUS-Gens aufwiesen. Methylierung der transkribierten Sequenz wurde häufig in Zusammenhang mit PTGS detektiert (English *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997, Elmayan *et al.* 1998).

In Studien von Assaad *et al.* (1993) und Ye und Signer (1996) wurde durch Reportergene in repetitiver Anordnung auf einer T-DNA transkriptionelles Gen-Silencing ausgelöst. Der Unterschied zu den hier vorgestellten Ergebnissen könnte darin liegen, dass die multiplen Kopien durch Rekombination an einem Locus in *Arabidopsis* erzeugt wurden, wobei diese mit Paarung homologer DNA-Sequenzen verbunden ist. Paarung homologer DNA-Sequenzen ist vermutlich auch die Ursache eines Mechanismus zur Inaktivierung homologer DNA-Sequenzen in der sexuellen Phase von *Neurospora* (zusammengefasst in Selker 1999). In *Drosophila* können repetitive Sequenzen an einem Locus Heterochromatin induzieren (Dorer und Henikoff 1994). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den hier vorgestellten Untersuchungen, bei denen ein Einfluss durch Paarung homologer DNA-Sequenzen ausgeschlossen werden konnte. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass in verschiedenen Organismen und in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Organismus verschiedene Mechanismen zur Inaktivierung von homologen Sequenzen Verwendung finden können. In *Neurospora* sind drei Mechanismen in verschiedenen Entwicklungsphasen

des Pilzes bekannt. Zwei sind vermutlich RNA-vermittelte Inaktivierungsmechanismen (Shiu *et al.* 2001, Cogoni und Macino 1997), einer ist wahrscheinlich DNA-vermittelt (zusammengefasst in Selker 1999).

Auch bei einer Erhöhung der SPT-Kopienzahl wurde eine negative Korrelation zwischen Kopienzahl der SPT-Gene und ihrer Gesamt-Expression nachgewiesen (3.3.3). Allerdings wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den GUS-Genen Silencing erst bei 9 Kopien festgestellt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass Silencing bereits bei 7 oder 8 Kopien ausgelöst wird.

Ein weiterer Unterschied war das Auftreten von verkürzten SPT-Transkripten in Linien mit posttranskriptionell inaktivierten SPT-Genen (ca. 600 b, 700 b und 850 b, Vollängentranskript 1100 b). Es konnte nahegelegt werden, dass das 5'-Ende der SPT-mRNA in den verkürzten Transkripten nicht mehr vorhanden ist. Vermutlich sind die verkürzten Transkripte Abbauprodukte. Interessanterweise liegen innerhalb der codierenden Sequenz des SPT-Gens zwei 9 b und zwei 12 b lange, nur aus den Basen Guanin und Cytosin bestehende Sequenzen vor, die komplementär zueinander sind (Abb. 29). Eine Paarung dieser Sequenzen könnte daher erfolgen. In der transkribierten Sequenz des GUS-Gens wurden derartige Homologien nicht gefunden. Das Auftreten der verkürzten SPT-Transkripte, denen vermutlich etwa 250, 400 und 500 Basen des 5'-Endes der SPT-mRNA fehlen, könnte in direktem Zusammenhang mit einer möglichen Sekundärstruktur der SPT-mRNA stehen, da die Sequenzen mit den komplementären 9 und 12 Basen im Bereich 227 bis 262 Basen bzw. 462 bis 503 Basen vom 5'-Ende des SPT-Gens gesehen liegen (Abb. 29). Die sehr energiereiche Bindung dieser GC-reichen Sequenz, könnte verhindern, dass die RNA vollständig abgebaut wird. Denkbar wäre auch, dass eine RNA-Helicase die Sekundärstruktur der SPT-mRNA nur zum Teil aufwinden kann. Für eine RNA-Helicase konnte eine Beteiligung an PTGS nachgewiesen werden (Dalmay *et al.* 2001). Zwar ist zu berücksichtigen, dass dsRNA sehr effizient PTGS bzw. RNAi auslösen kann (zusammengefasst in Zamore 2001), allerdings wurde in *C. elegans* nachgewiesen, dass die dsRNA mindestens 26 bp aufweisen muss (Parrish *et al.* 2000).

In einigen Fällen von PTGS wurden auch verkürzte Transkripte nachgewiesen (Metzlaff *et al.* 1997, van Eldik *et al.* 1998, Han und Grierson 2002). Die verkürzten Transkripte wurden mit der Sekundärstruktur der mRNA erklärt. In allen Studien wurden nicht polyadenylierte verkürzte Transkripte, die Homologie zum 5'-Ende der mRNA aufwiesen, und polyadenylierte verkürzte Transkripte, die Homologie zum 3'-Ende der mRNA zeigten, detektiert. Daher wurde endonukleolytischer Abbau der mRNA vorgeschlagen. Weitere Untersuchungen zu den verkürzten SPT-Transkripten werden Aufschluss darüber geben, ob ein vergleichbarer Mechanismus besteht.

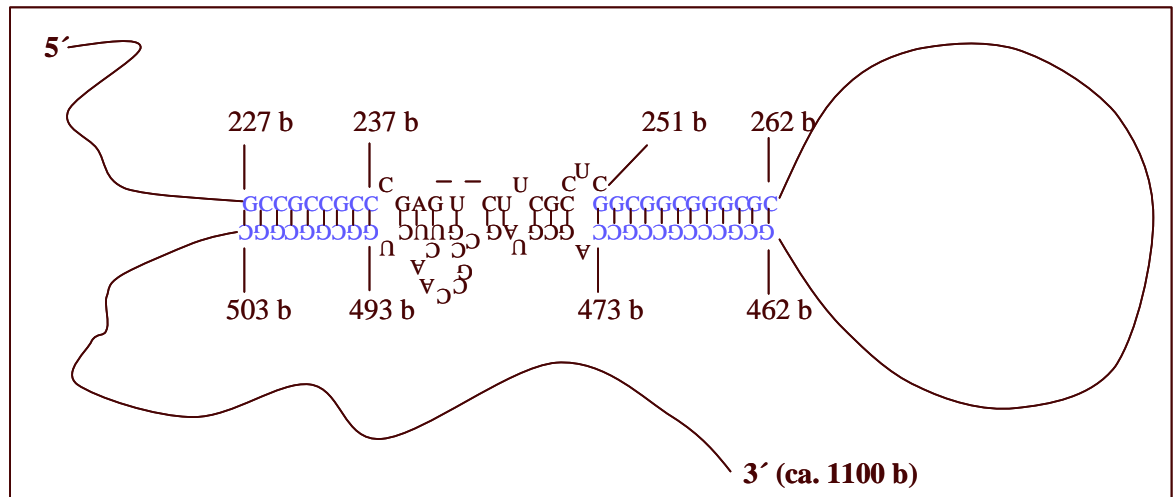


Abbildung 29: Mögliche Sekundärstruktur der SPT-mRNA. Es ist nur ein Teil der Sekundärstruktur detailliert dargestellt. Die Ermittlung der Sekundärstruktur erfolgte unter www.genebee.msu.su. Blau markierte Basen geben die beiden 9 und 12 b langen Bereiche an, die komplementäre Bereiche in der SPT-mRNA haben. Die übrige SPT-mRNA ist nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Zahlen geben die Entfernung vom 5'-Ende der mRNA an. Es ist berücksichtigt, dass Uracil eine „wobble“-Paarung mit Guanin eingehen kann.

Der Nachweis von siRNAs der SPT- und OCS-3'-Sequenz und von Methylierung der codierenden Sequenz des SPT-Gens gab auch für das Silencing der SPT-Gene wichtige Hinweise, dass es auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den GUS-Konstrukten konnte nur CG-Methylierung nachgewiesen werden (3.3.4). Silencing der SPT-Gene wurde ausgelöst, wenn drei oder 4 Loci mit jeweils drei hoch exprimierenden Kopien kombiniert wurden. Daher wird auch das Silencing der SPT-Gene sehr wahrscheinlich durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert verursacht (3.3.3).

In vielen Fällen von PTGS wurde die Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert als Auslöser von PTGS nahegelegt (Lindbo *et al.* 1993, Dehio und Schell 1994, Que *et al.* 1997, Elmayer *et al.* 1998). In dieser Arbeit konnte dies nachgewiesen werden. In *Drosophila* konnte ebenso gezeigt werden, dass Cosuppression durch hohe Transkriptmengen über einem Schwellenwert verursacht wird (Pal-Bhadra *et al.* 2002).

Pflanzen mit zwei GUS-Kopien wiesen geringe Unterschiede in der Expression des GUS-Gens auf. Daher liegt in manchen Pflanzen die Transkript-Menge mit größerer Wahrscheinlichkeit am bzw. über dem Schwellenwert als in anderen Pflanzen, was in Einzelfällen zu Silencing führte (3.3.7, Gils 2000). Umgekehrt wiesen isogene Nachkommen von Pflanzen, die drei oder vier Kopien der GUS-Gene enthielten, hohe oder geringe GUS-Expression auf (3.3.6, Schubert 1999). Die Wahrscheinlichkeit des Auslösens von Silencing steigt also mit erhöhter Kopienzahl und damit Transkript-Menge und mit fortschreitendem Alter der Pflanzen. So weisen z.B. Linien mit 4 Kopien des GUS-Gens eine höhere

Frequenz an Pflanzen, die GUS-Silencing zeigen, mit zunehmendem Alter auf als Pflanzen mit zwei Kopien (Schubert 1999). Wenn PTGS einmal ausgelöst wurde, wird es mitotisch nicht mehr revertiert und breitet sich systemisch in der Pflanze aus (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998).

Das posttranskriptionelle Silencing der SPT- und GUS-Gene wurde bei unterschiedlichen Kopienzahlen durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst. Der Unterschied ist wahrscheinlich nur durch die translatierte Sequenz der Reportergene bedingt, da die T-DNA, der verwendete 35S-Promotor, der transkribierte, aber untranslatierte Ω -Leader und das OCS-3'-Ende bei den verschiedenen Konstrukten identisch sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Linien, die zwei SPT-Kopien enthalten, eine höhere SPT- als GUS-mRNA-Menge in Linien mit zwei GUS-Kopien vorliegt (3.3.10). Eine Bestimmung der Molekülzahl der SPT- bzw. GUS-mRNA bestätigte, dass eine höhere SPT-als GUS-mRNA-Menge besteht (Lechtenberg unveröffentlicht). Es kann allerdings keine Aussage über die Stabilität der verschiedenen mRNAs gemacht werden. Ob die höhere SPT-Transkriptmenge durch höhere Transkription der SPT-Gene als der GUS-Gene verursacht sein könnte, muss durch quantitative Run-On-Analysen der beiden Reportergene in Linien mit gleicher Reportergenkopienzahl geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können daher nur vermuten lassen, dass nicht eine geringere Transkription der SPT-Gene für das Silencing bei höheren Kopienzahlen, sondern ein höherer, also Gen-spezifischer Schwellenwert für SPT-mRNA besteht, der zum Silencing der SPT-Gene überschritten werden muss.

In anderen Studien wurde die Expression eines GFP-Gens (*green fluorescent protein*) in transgenen *A. thaliana* Pflanzen untersucht (Forsbach 2001, Lechtenberg unveröffentlicht). Die verwendeten Konstrukte waren bis auf die codierende Sequenz des GFP-Gens identisch zu den hier besprochenen SPT- bzw. GUS-Konstrukten mit einer Kopie des jeweiligen Reportergens. Pflanzen mit bis zu vier Kopien des GFP-Gens wiesen kein Silencing der GFP-Gene auf (Forsbach 2001, Lechtenberg unveröffentlicht). Es wurden vergleichbare GFP- und SPT-, aber höhere als GUS-Transkript-Mengen gefunden. Bei höheren Kopienzahlen des GFP-Gens wurde Silencing festgestellt (Lechtenberg unveröffentlicht).

Die SPT- und GFP-mRNAs sind mit 1,1 kb wesentlich kürzer als die GUS-mRNA (2,1 kb). Eine Korrelation zwischen Transkriptlänge und Genexpression wurde allerdings in *Arabidopsis* nicht gefunden (Duret und Mouchiroud 1999). Alle drei Gene unterscheiden sich erheblich im GC-Gehalt der Protein-codierenden Sequenz (SPT 68 % GC, GUS 52 % GC, GFP 45 % GC). Hoch exprimierte *Arabidopsis* Gene enthalten häufig einen höheren GC-Anteil (Chiapello *et al.* 1998). Dieser Befund kann allerdings nicht erklären, warum das GFP-Gen trotz geringerem GC-Gehalt als das GUS-Gen bei höheren Kopienzahlen Silencing als das GUS-Gen aufweist. Analysen der Codon-Verwendung in *A. thaliana* zeig-

ten, dass hochexprimierte Gene häufiger Codons mit einem Cytosin in der dritten stillen Position eines Codons aufweisen (Mathé *et al.* 1999). 44 % der in der SPT-mRNA verwendeten Codons besitzen ein C an der dritten Position, während dies bei der GUS-mRNA nur 31 % sind. Das GFP-Gen weist trotz des geringsten GC-Gehaltes der drei Gene bei 34 % der Codons ein C in der dritten Position auf. Diese Unterschiede könnten mit dem Silencing von GFP- und GUS- bzw. SPT- und GUS-Genen bei unterschiedlichen Kopienzahlen bzw. Transkriptmengen in Zusammenhang stehen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, bei denen die Erhöhung der Zahl der Codons mit einem C oder G in der dritten Position in der GFP-Sequenz ohne Veränderung der Aminosäuresequenz zu einer höheren Frequenz an transgenen Tabakpflanzen führte, die das GFP-Gen hoch exprimierten (Rouwendal *et al.* 1997). Die Erhöhung der maximalen GFP-Expression war allerdings nur gering.

Es wäre denkbar, dass eine zu hohe Transkriptmenge eines Gens mit der Translation seiner mRNA interferiert. Das Auftreten von Codons für seltene tRNAs könnte bei einer zu geringen Menge der entsprechenden tRNAs zu einer weniger effizienten Translation führen und damit eine Erkennung der mRNA als „aberrante mRNA“ ermöglichen. Eine RNA-abhängige RNA-Polymerase könnte komplementäre RNA synthetisieren, so dass dsRNA entsteht, die durch eine dsRNA-spezifische RNase abgebaut werden könnte. DsRNA ist ein effizienter Auslöser von Silencing (Waterhouse *et al.* 1998, Mette *et al.* 2000). Es wurde nahegelegt, dass für einen posttranskriptionellen Abbau von mRNA die mRNA nicht Ribosomen gebunden sein muss (Holtorf *et al.* 1999). Diese Experimente konnten allerdings nicht ausschließen, dass die Initiation von PTGS mit Translation verbunden ist. Die Aufrechterhaltung von Silencing und Amplifikation des Signals könnte dagegen Ribosomen-ungebunden ablaufen.

Andererseits könnte das Vorliegen von großen mRNA-Mengen zu einer intra- oder intermolekularen Paarung der mRNAs führen, was wiederum Abbau initiieren könnte (Metzlaff *et al.* 1997). Die entstehende, zumindest teilweise doppelsträngige RNA könnte durch dsRNA-spezifische RNasen abgebaut werden. Die mögliche außergewöhnliche Sekundärstruktur der SPT-mRNA und das Silencing der SPT-Gene erst bei hohen Transkriptmengen steht allerdings nicht im Einklang mit dieser Theorie. Die mögliche Sekundärstruktur der SPT-mRNA könnte vielmehr ein Grund dafür sein, dass höhere Transkriptmengen an SPT-mRNA als an GUS-mRNA für das Auslösen von Silencing benötigt werden. Es wäre denkbar, dass der Abbau der mRNA durch vermutlich beteiligte Enzyme wie RNA-Helicasen und RNasen durch die Sekundärstruktur erschwert ist.

Um die oben aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, muss die Expression und das Silencing weiterer Gene untersucht werden, die sich in Länge und GC-Gehalt unterscheiden.

Eine Veränderung der SPT-, GUS- oder GFP-Sequenzen ohne Veränderung der Aminosäuresequenzen könnte weitere Erkenntnisse liefern.

4.4 Analyse der GUS-Aktivität in *N. tabacum*

N. tabacum wurde mit den T-DNA Konstrukten Gus 2xf und Gus 3xr transformiert. Da diese Konstrukte identisch mit den in *A. thaliana* verwendeten waren, sollten konstruktbedingte Effekte auf die Expression der in den Konstrukten befindlichen GUS-Gene ausgeschlossen sein. Mögliche Unterschiede in der GUS-Expression in *Arabidopsis* und Tabak könnten daher Spezies-spezifisch sein. Mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen konnten Pflanzen identifiziert werden, die nur eine Kopie der T-DNA aufwiesen. Es wurden auch die in *N. tabacum* identifizierten Linien, die rekombinierte, aber intakte GUS-Gene aufwiesen, in die Analyse einbezogen (4.1). Insgesamt konnten drei Linien mit dem Gus 1xr-, zwei Linien mit dem Gus 2xf-, zwei Linien mit dem Gus 2xr-Konstrukt und 5 Linien mit dem Gus 3xr-Konstrukt mit einer Kopie der T-DNA identifiziert werden (3.4.1). Die GUS-Aktivität wurde in Nachkommen von für die T-DNA hemizygoten Linien bestimmt. Es konnte keine Aussage gemacht werden, in welchen Nachkommen die T-DNA hemi- oder homozygot vorlag. Dies ist erst in der nächsten Generation mit Hilfe von Segregationsanalysen auf Kanamycin-haltigem Medium möglich.

Bei drei Wochen alten Linien mit einer oder zwei GUS-Kopien wurde bei allen Nachkommen einer Linie hohe und einheitliche GUS-Aktivität, bei Linien mit höherer Kopienzahl in einigen Nachkommen dagegen Silencing nachgewiesen. Transgene Linien, die das Gus 3xr-Konstrukt enthielten, zeigten bei einer größeren Anzahl von Pflanzen Silencing als Linien, die ein Gus 2xf- oder Gus 2xr-Konstrukt besaßen. Diese Ergebnisse waren den in *A. thaliana* erhaltenen vergleichbar (4.3). 11 Wochen alte Pflanzen wiesen unabhängig von der Kopienzahl des GUS-Gens Silencing auf. Allerdings war das Silencing bei Linien, die das Gus 3xr-Konstrukt enthielten, stärker ausgeprägt, da nur in sehr wenigen Pflanzen noch geringe GUS-Aktivität nachgewiesen wurde (3.4.2). Transgene *Arabidopsis* Pflanzen mit einer oder zwei GUS-Kopien wiesen dagegen nur in Ausnahmefällen Silencing der GUS-Gene auf (3.3.7). Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Linien, die ein oder zwei GUS-Gene aufwiesen, kamen auch zu dem Ergebnis, dass Silencing der GUS-Gene bereits bei einer Kopie des GUS-Gens in *N. tabacum* ausgelöst wird (Lechtenberg unveröffentlicht). Da Zunahme des Silencings mit zunehmendem Alter der Pflanzen und meiotische Reversibilität des Silencings festgestellt wurde (3.4.2), kann analog den Ergebnissen in *A. thaliana* ein posttranskriptioneller Abbau der mRNA, der durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst wird, angenommen werden. In Studien von Elmayan und Vaucheret (1996) und Elmayan *et al.* (1998) wurden

identische Konstrukte, die ein GUS-Gen unter einem doppelten 35S Promotor enthielten, in *N. tabacum* und *A. thaliana* eingeführt und Linien mit einer Kopie der T-DNA identifiziert. Silencing der GUS-Gene wurde in beiden Spezies, unabhängig davon, ob die T-DNA hemi- oder homozygot vorlag, nachgewiesen. In *Arabidopsis* zeigten allerdings noch einige der für die T-DNA hemizygoten isogenen Nachkommen einer Pflanze hohe Expression. Das Silencing war also, analog den hier vorgestellten Ergebnissen, in *N. tabacum* stärker ausgeprägt als in *Arabidopsis*.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Spezies-spezifische Unterschiede für das Silencing eines Gens unter der Kontrolle des 35S Promotors bestehen. Die Ermittlung der für diesen Unterschied verantwortlichen Faktoren ist schwierig, weil eine Standardisierung der durch den 35S Promotor verliehenen Expression der GUS-Gene in *Arabidopsis* im Vergleich zu Tabak nicht möglich ist. Die in *Arabidopsis* und Tabak ermittelten Unterschiede könnten auch durch die unterschiedliche Lebensdauer der Arten, die verschiedenen Wachstumsbedingungen, den unterschiedlichen Ploidiegrad und abweichende Codon-Verwendung erklärt werden. Die Ergebnisse geben allerdings erste Hinweise darauf, dass der Einfluss der komplexen Genomstruktur von *N. tabacum* auf die Expression der GUS-Gene gering ist, weil die observierten Silencing-Phänomene wahrscheinlich in allen Tabaklinien durch hohe Transkriptmengen und nicht durch einen Positionseffekt ausgelöst wurden. Allerdings muss dies für weitere Linien bestätigt werden.

4.5 Partielle Aufrechterhaltung der Methylierung trotz meiotischer Reversion von PTGS

Untersuchungen zur Vererbung des Silencings der GUS-Gene zeigten, dass dieses meiotisch reversibel ist (3.3.8, Schubert 1999). Dies ist ein generelles Merkmal von PTGS (Dehio und Schell 1994, Elmayan und Vaucheret 1996, zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Analysen zur Methylierung der transkribierten Sequenz der GUS-Gene zeigten, dass die Methylierung von mehreren *HpaII*-Schnittstellen trotz Reversion von Silencing vererbt wird (3.5.1). *HpaII* kann bei Methylierung eines Cytosins in der Erkennungssequenz 5'-CCGG-3', also bei CG- oder CNG-Methylierung nicht schneiden. Mit dem Restriktionsenzym *AluI* wurde in Linien, die Silencing der GUS-Gene aufwiesen, CNG- und asymmetrische Methylierung der transkribierten Sequenz des GUS-Gens nachgewiesen (3.3.9). Eine Vererbung der Methylierung von *AluI*-Schnittstellen in Linien, die Reversion von Silencing aufwiesen, wurde nicht gefunden (3.3.9, 3.5.1). Die mit *HpaII* und *AluI* erhaltenen Ergebnisse legen daher nahe, dass nur CG-Methylierung (von *HpaII*-Schnittstellen) meiotisch vererbt wurde.

Die Linie Gus 1xr 30 wies die höchste GUS-Expression aller untersuchten Linien mit einem Gus 1xf- oder Gus 1xr-Konstrukt auf (3.3.6, 3.3.10). Daher ist in dieser Linie die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Silencing durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst wird und damit Methylierung der transkribierten Sequenz des GUS-Gens auftritt (4.3.4). Interessanterweise wurde nur bei dieser Linie unter allen Linien, die eine Gus 1xf- oder Gus 1xr-T-DNA homozygot trugen, Methylierung von *HpaII*-Schnittstellen im GUS-Gen gefunden (3.5.1). Methylierung von *AluI*-Schnittstellen wurde aber nicht detektiert.

In allen Linien, die methylierte, hoch exprimierte GUS-Gene enthielten, wurden keine oder nur sehr geringe Mengen an siRNAs der GUS-Gene im Gegensatz zu Linien mit inaktivierten, methylierten GUS-Genen nachgewiesen (3.5.2). Bei der einen Linie, für die unter Umständen siRNAs nachgewiesen wurden, war das Auftreten der siRNAs vermutlich auf beginnendes Silencing zurückzuführen. Es kann also angenommen werden, dass siRNAs spezifisch bei PTGS gefunden werden, während dies zumindest für CG-Methylierung nicht zutrifft. Möglicherweise spielt allerdings CNG- oder asymmetrische Methylierung eine wichtige Rolle bei PTGS, wobei CNG- oder asymmetrische Methylierung bei posttranskriptionell inaktivierten SPT-Genen nicht gefunden wurde (3.3.4). In Mutanten, in denen CNG-Methylierung verhindert war, wurde Aufhebung der epigenetischen Inaktivierung des *superman* Gens nachgewiesen, wobei allerdings nicht klar ist, ob TGS oder PTGS die Inaktivierung verursacht (Lindroth *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass mit PTGS verbundene Methylierung vererbt wird. Andere Studien mit einem posttranskriptionell stillgelegten GUS-Gen konnten nicht nachweisen, dass CG-Methylierung meiotisch vererbt wird (Mallory *et al.* 2001). Allerdings wurde die Analyse in Tabak durchgeführt, und es wurde nur die Methylierung einer Schnittstelle analysiert. Auch in Untersuchungen zu Virus-induziertem PTGS wurde keine Vererbung der Methylierung nachgewiesen (Jones *et al.* 2001).

Bei Methylierung im Zusammenhang mit TGS konnte meiotische Vererbung der symmetrischen Methylierung des Promotors und Vererbung des Silencings gezeigt werden (Park *et al.* 1996, Jones *et al.* 2001). Meiotische Vererbung von TGS wurde jedoch nicht mehr gefunden, wenn keine symmetrische Methylierung des Promotors aufgrund fehlender CG-Di- und CNG-Trinukleotide erfolgen konnte (Dieguez *et al.* 1998) oder CG-Methylierung durch Ausschalten einer Methyltransferase verhindert war (Jones *et al.* 2001). CG-Methylierung des Promotors ist daher wahrscheinlich für die Vererbung von TGS von essentieller Bedeutung. Vererbung der CG-Methylierung der codierenden Sequenz eines posttranskriptionell stillgelegten Gens ist dagegen nicht mit der Vererbung von PTGS verbunden, wie diese Arbeit zeigen konnte.

Weiterhin legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass zumindest CG-Methylierung der codierenden Sequenz eines Gens keinen Einfluss auf die Expression des Gens hat. Eine Produktion von aberranten Transkripten, ausgelöst durch Methylierung der codierenden Sequenz, als Ursache von Silencing, wie es häufig vorgeschlagen wurde (u.a. Baulcombe 1996), ist daher unwahrscheinlich.

Um weitere Erkenntnisse über die Vererbung von symmetrischer und asymmetrischer Methylierung zu erhalten, müssen weitere Methylierungs-sensitive Enzyme, z.B. die Restriktionsendonukleasen *MspI* oder *HapII*, die dieselbe Schnittstelle wie *HpaII* (5'-CCGG-3') erkennen, aber nur bei CNG- (*MspI*) oder CG- (*HapII*) Methylierung nicht schneiden, oder Bisulfit-Sequenzierung zum Nachweis von Methylierung eingesetzt werden, wie z.B. von Lindroth *et al.* (2001) gezeigt.

4.6 Der Einfluss genetischer Modifikatoren auf posttranskriptionell stillgelegte Transgene

In vielen Organismen sind PTGS vergleichbare Mechanismen und einige der an diesen Mechanismen beteiligten Gene bekannt. Die mechanistische und genetische Analyse von PTGS zeigt große Gemeinsamkeiten von PTGS in Pilzen, Tieren und Pflanzen. In vielen Fällen konnte eine Beteiligung homologer Gene an PTGS nachgewiesen werden (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001). Daher lag es nahe, mit Hilfe von reverser Genetik nach Insertionen in *Arabidopsis* Genen zu suchen, die Homologie zu Modifikatoren von PTGS aus anderen Organismen aufweisen. Homologe zu Genen aus anderen Organismen können in *Arabidopsis* leicht identifiziert werden, weil das *Arabidopsis* Genom fast vollständig sequenziert ist (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). In *N. crassa* konnte eine wichtige Rolle zweier RdRPs an unterschiedlichen epigenetischen Mechanismen gezeigt werden (Shiu *et al.* 2001, Cogoni und Macino 1999a). In *C. elegans* wurde nachgewiesen, dass zwei RdRPs eine Funktion bei RNAi besitzen (Sijen *et al.* 2001, Smardon *et al.* 2000). Bei letzteren Untersuchungen konnte eine wichtige Rolle der RdRP und damit von RNAi an der Entwicklung von *C. elegans* gezeigt werden. In Tabak wurde eine RdRP in Zusammenhang mit Virusabwehr identifiziert (Xie *et al.* 2001), und in *Arabidopsis* konnte eine Beteiligung einer RdRP an PTGS bewiesen werden (Akzessionsnummer At3g49500, Mourrain *et al.* 2000, Dalmay *et al.* 2000). Im *Arabidopsis* Genom sind 6 RdRP-Gene annotiert (Mourrain *et al.* 2000).

In dieser Arbeit konnte im Gen einer RdRP aus *Arabidopsis* eine T-DNA-Insertion identifiziert werden (Akzessionsnummer At4g11130). Zwar wurde nicht nachgewiesen, dass dies zu einer Ausschaltung der Gen-Aktivität führte, allerdings lag die Insertion im zweiten Exon des Gens und 5' einer Sequenz, die bei allen RdRPs konserviert ist (Mourrain *et al.*

2000), so dass das Fehlen dieses Bereiches zu einer Ausschaltung der Gen-Aktivität führen sollte. Pflanzen, die eine T-DNA im Gen der RdRP homozygot trugen, zeigten unter den gewählten Untersuchungsbedingungen keinen morphologischen Phänotyp. Es wurden Kreuzungen mit Linien, die eine hohe Expression oder Silencing der GUS-Gene aufwiesen, durchgeführt und Pflanzen identifiziert, die die T-DNA-Insertion im Gen der RdRP homozygot und die Reporter-T-DNA hemi- oder homozygot trugen. Diese Pflanzen zeigten keine Veränderung der GUS-Aktivität im Vergleich zu Pflanzen mit intaktem RdRP-Gen (3.6). Allerdings ließen erste Experimente zur Methylierung der GUS-Gene vermuten, dass in Linien mit einer wahrscheinlichen Ausschaltung der RdRP stärkere Methylierung gefunden wird. Dies könnte auf einen supprimierenden Effekt der RdRP in Bezug auf Methylierung der posttranskriptionell stillgelegten Transgene hindeuten. Allerdings müssen diese Analysen verifiziert werden. Es müssen weitere Experimente z.B. zu siRNAs oder Kreuzungen mit der bereits bekannten *Arabidopsis*-RdRP-Mutante durchgeführt werden. Außerdem muss eindeutig gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit identifizierte T-DNA-Insertion eine Ausschaltung der Gen-Aktivität der RdRP verursacht.

In einem weiteren auf reverser Genetik basierenden Ansatz konnte eine T-DNA-Insertion in einem homologen Gen einer DNA-Helicase identifiziert werden. Homologe Proteine in *C. elegans* (*mut-7*, Ketting *et al.* 1999) und *N. crassa* (*qde2*, Cogoni und Macino 1999b) sind an PTGS-vergleichbaren Mechanismen beteiligt. Erste Analysen von Pflanzen, die eine T-DNA-Insertion homozygot trugen, zeigten, dass unter den gewählten Untersuchungsbedingungen kein morphologischer Phänotyp beobachtet wird.

4.7 Bedeutung dieser Arbeit für die Analyse von Transgen-Populationen

Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten (Forsbach 2001, Gils 2000, Lechtenberg 1999) wurde stabile und hohe Expression von Reporter Genen unter dem 35S Promotor in geringer Kopienzahl bei über 80 T-DNA-Transformanten in *Arabidopsis* gefunden (4.3.1). Ab bestimmten Kopienzahlen wurde dagegen ausnahmslos in allen Linien posttranskriptionelles Silencing festgestellt (4.3.4). Das Silencing wird durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst, Paarung homologer DNA-Sequenzen (4.3.4) und Produktion von aberranten Transkripten zumindest durch CG-Methylierung der transkribierten Sequenz eines Gens (4.5) als Auslöser des Silencings konnten ausgeschlossen werden.

Die häufig beobachtete verringerte Transmission der T-DNA in T-DNA-Populationen ist zumindest in Konstrukten, die mit den in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar sind, nicht auf epigenetische Inaktivierung des Transformationsmarkers zurückzuführen, son-

dern auf Mutationen in essentiellen Genen, die vermutlich durch Insertion der T-DNA verursacht sind (4.2).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Linien, die invertierte Sequenzwiederholungen zweier T-DNAs trugen, hohe Expression der auf den T-DNAs befindlichen Reportergene vermittelt wurde (4.3.3). Ein Einfluss durch eine mögliche Paarung homologer DNA-Sequenzen in den invertierten Sequenzwiederholungen konnte damit ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse dieser Arbeit daher nahe, dass der Großteil der beobachteten Silencing-Phänomene bei T-DNA-Transformanten RNA-vermittelt und daher posttranskriptionell geschieht. Das durch invertierte Sequenzwiederholungen ausgelöste, häufig beschriebene Silencing beruht vermutlich auf Transkription der invertierten Sequenzwiederholung (zusammengefasst in Selker 1999).

Die am Anfang dieser Arbeit beschriebene Variabilität der Transgen-Expression in *Arabidopsis* T-DNA-Transformanten, wie z.B. von Holtorf *et al.* (1995) beschrieben, ist zumindest bei der Verwendung starker Promotoren nicht durch Einflüsse des Integrationsortes, sondern in erster Linie durch Kopienzahl- bzw. Transkriptmengeneffekte bedingt. Isogene Nachkommen einer Pflanze und für die T-DNA hemi- oder homozygote Pflanzen können je nach Kopienzahl des Transgens sehr hohe Expression oder Silencing des Transgens aufweisen. Zunahme von Silencing aufweisenden Pflanzen wurde mit fortschreitendem Alter beobachtet (3.3.6). Führt man daher Untersuchungen zur Expression eines Transgens nur zu einem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und an genetisch und molekularbiologisch nicht charakterisierten transgenen Pflanzen durch, so erhält man eine große Variabilität der Transgenexpression.

Wie diese Arbeit zeigen konnte, wird das Silencing von Transgenen unter der Kontrolle eines starken Promotors durch die Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert ausgelöst. Dieser Schwellenwert ist vermutlich Gen-spezifisch (4.3.4). Die Ergebnisse lassen daher vermuten, dass für die Expression jedes Gens ein Schwellenwert besteht, so dass Überexpression eines Gens nur bis zu einer gewissen Transkriptmenge erfolgen kann. Für einige Gene könnte dieser Schwellenwert sehr niedrig liegen. Dies könnte dazu führen, dass diese Gene nicht mit einem starken Promotor überexprimiert werden können, weil selbst bei einer Kopie des Transgens (und der unter Umständen vorliegenden endogenen Kopie des Gens) Silencing ausgelöst wird.

Die Ergebnisse in *N. tabacum* deuten an, dass ähnliche Mechanismen wie in *Arabidopsis* zur Regulation von sehr hoch exprimierten Transgenen bestehen (4.4). Die in *Arabidopsis* erhaltenen Ergebnisse können aber nicht direkt auf andere Spezies übertragen werden, da trotz Verwendung identischer Promotoren und Reportergene Silencing des Reportergens in *N. tabacum* bei geringeren Kopienzahlen des Reportergens ausgelöst wurde.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Regulation der Transgenexpression und des Transgen-Silencings in *A. thaliana* und *N. tabacum* durchgeführt.

Die Expressionsanalyse von 25 transgenen *Arabidopsis* Linien mit zwei, vier oder sechs Kopien eines chimären Streptomycinphosphotransferasegens (SPT) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors ergab eine einheitlich hohe und über alle untersuchten Generationen stabile Expression bei Transformanten mit gleicher Kopienzahl des SPT-Gens. Vorherige Analysen hatten gezeigt, dass transgene *Arabidopsis* Pflanzen mit zwei Kopien eines chimären β -Glucuronidasegens (GUS) unter dem 35S Promotor hohe stabile Expression der GUS-Gene aufwiesen. Der Vergleich der Expression zwischen Linien mit zwei bis sechs SPT-Kopien zeigte eine positive Korrelation bezüglich Kopienzahl und Expression. Transformanten, deren T-DNAs in unterschiedlichen Positionen im Genom vorlagen, wiesen eine vergleichbar hohe Reporterexpression auf. Daher konnte ein bedeutender Einfluss der chromosomalen Umgebung auf die Reporterexpression weitgehend ausgeschlossen werden. Invertierte Sequenzwiederholungen zweier T-DNAs mit SPT-Genen führten zu keiner Beeinflussung der SPT-Expression.

Ab drei Kopien des GUS-Gens und neun Kopien des SPT-Gens wurde posttranskriptionelles Gen-Silencing festgestellt. Der Nachweis von siRNAs und Methylierung der transkribierten DNA-Sequenz konnte in diesen Linien erbracht werden. Bei Linien, die SPT-Silencing aufwiesen, wurden verkürzte SPT-Transkripte detektiert. Das Silencing wurde durch Erhöhung der Transkriptmenge über einen Schwellenwert verursacht. Es konnten Hinweise erbracht werden, dass ein Gen-spezifischer Schwellenwert für das Auslösen von Silencing der SPT- und GUS-Gene besteht.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz meiotischer Reversion von posttranskriptionellem Silencing der GUS-Gene die Methylierung der codierenden Sequenz des GUS-Gens zum Teil meiotisch vererbt wird. Diese interferiert nicht mit der Expression der GUS-Gene.

In *N. tabacum* wurde im Gegensatz zu *A. thaliana* Silencing des GUS-Gens bereits mit einer GUS-Kopie unter der Kontrolle des 35S Promotors ausgelöst. Dies beruht vermutlich auch auf einem posttranskriptionellen Mechanismus.

Die vermutliche Ausschaltung einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *A. thaliana* führte zu keiner Beeinflussung des posttranskriptionellen Silencings der GUS-Gene.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Variabilität der Transgen-Expression in *A. thaliana* T-DNA Transformanten nicht durch den Integrationsort, sondern durch Kopienzahl- bzw. Transkriptmengen-Effekte verursacht wird und der Großteil der beobachteten Silencing-Phänomene RNA-vermittelt ist.

6 Abstract

This study focused on the regulation of transgene expression and silencing in *A. thaliana* und *N. tabacum*.

Expression analysis of 25 transgenic *Arabidopsis* lines harboring two, four or six copies of a chimaeric Streptomycinphosphotransferase gene (SPT) controlled by the CaMV 35S promoter revealed a uniformly high and stable expression over the course of all analysed generations in transformants with similar copy numbers of the SPT gene. Earlier studies on transgenic *Arabidopsis* lines containing two copies of a chimaeric β -Glucuronidase gene (GUS) under the control of the 35S promoter had shown stable expression of the GUS gene. Comparison of the expression of the SPT gene in lines with two to six copies revealed a positive correlation between copy number and expression level. T-DNAs, which were present at different loci in the *Arabidopsis* genome, conferred a similar level of reporter gene activity. Therefore, a pronounced influence of the chromosomal environment on reporter gene expression was not found. Inverted repeats of two T-DNAs with SPT genes did not influence SPT expression.

Three or more copies of the GUS gene or nine or more copies of the SPT gene triggered posttranscriptional gene silencing. Small interfering RNAs and methylation of the transcribed region in these lines were observed. Truncated SPT transcripts were detected in lines showing silencing of the SPT genes. Increase of transcript level surpassing a threshold triggered silencing. Indications for a gene-specific threshold for initiation of SPT or GUS silencing were observed.

Posttranscriptional gene silencing of the GUS gene was meiotically reversible but methylation of the coding region was partly maintained. This methylation does not interfere with expression of the GUS genes.

In contrast to *A. thaliana* silencing of the GUS gene under the control of the 35S promoter was triggered with one copy in *N. tabacum*. A posttranscriptional mechanism can be suggested.

Posttranscriptional gene silencing of the GUS gene in *A. thaliana* persisted in lines with a presumable gene knock out of a putative RNA dependent RNA polymerase.

This study suggests that variability of transgene expression in *A. thaliana* T-DNA transformants is caused by transcript level effects rather than by position effects. Generally, most observed silencing phenomena are probably RNA-mediated.

7 Literaturverzeichnis

- Akhtar A., Zink D. und Becker P.B.** 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**: 405-9.
- Al-Kaff N.S., Covey S.N., Kreike M.M., Page A.M., Pinder R. und Dale P.J.** 1998. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**: 2113-5.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. und Lipman D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-10.
- Amedeo P., Habu Y., Afsar K., Scheid O.M. und Paszkowski J.** 2000. Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* **405**: 203-6.
- An Y., McDowell J., Huang S., McKinney E., Chambliss S. und Meagher R.** 1996. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* **10**: 107-21.
- Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M. Jr, Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L. und Vance V.B.** 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**: 142-4.
- Apuya N.R., Yadegari R., Fischer R.L., Harada J.J., Zimmerman J.L. und Goldberg R.B.** 2001. The *Arabidopsis* embryo mutant schlepperless has a defect in the chaperonin-60alpha gene. *Plant Physiol* **126**: 717-30.
- Arugmuganathan K. und Earle E.D.** 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* **9**: 208-18.
- Assaad F.F. und Signer E.R.** 1992. Somatic and germinal recombination of a direct repeat in Arabidopsis. *Genetics* **132**: 553-66.
- Assaad F.F., Tucker K.L. und Signer E.R.** 1993. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **22**: 1067-85.
- Axelos M., Bardet C., Liboz T., Le Van Thai A., Curie C. und Lescure B.** 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha: molecular cloning, characterization and expression. *Mol Gen Genet* **219**: 106-12.

- Aviezer-Hagai K., Nelson H. und Nelson N.** 2000. Cloning and expression of cDNAs encoding plant V-ATPase subunits in the corresponding yeast null mutants. *Biochim Biophys Acta*. **1459**: 489-98.
- Azpiroz-Leehan R. und Feldmann K.A.** 1997. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet* **13**: 152-6.
- Baker B., Coupland G., Fedoroff N., Starlinger P. und Schell J.** 1987. Phenotypic assay for excision of the maize controlling element Ac in tobacco. *EMBO J* **6**: 1547-54.
- Bancroft I., Bhatt A.M., Sjodin C., Scofield S., Jones J.D. und Dean C.** 1992. Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **233**: 449-61.
- Bartee L., Malagnac F. und Bender J.** 2001. Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev* **15**: 1753-8.
- Batard Y., Hehn A., Nedelkina S., Schalk M., Pallett K., Schaller H. und Werck-Reichhart D.** 2000. Increasing Expression of P450 and P450-Reductase Proteins from Monocots Monocots in Heterologous Systems. *Arch Biochem Biophysics* **379**: 161-9.
- Baulcombe D.C.** 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **32**: 79-88.
- Bechtold N., Ellis J. und Pelletier G.** 1993. In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris* **316**: 1194-9.
- Bell-Lelong D.A., Cusumano J.C., Meyer K. und Chapple C.** 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.* **113**: 729-38
- Bender J. und Fink G.R.** 1995. Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of Arabidopsis. *Cell* **83**: 725-34.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. und Hannon G.J.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-6

- Bonhomme S., Horlow C., Vezon D., de Laissardiere S., Guyon A., Ferault M., Marchand M., Bechtold N. und Pelletier G.** 1998. T-DNA mediated disruption of essential gametophytic genes in *Arabidopsis* is unexpectedly rare and cannot be inferred from segregation distortion alone. *Mol Gen Genet* **260**: 444-52.
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W. und Baulcombe D.C.** 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* **17**: 6739-46.
- Campisi L., Yang Y., Yi Y., Heilig E., Herman B., Cassista A.J., Allen D.W., Xiang H. und Jack T.** 1999. Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant J* **17**: 699-707.
- Chiapello H., Lisacek F., Caboche M. und Henaut A.** 1998. Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**: 1-38.
- Chow K.S., Singh D.P., Walker A.R. und Smith A.G.** 1998. Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins. *Plant J* **15**: 531-41.
- Chuang C. und Meyerowitz E. M.** 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4985-90.
- Church G.M. und Gilbert W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1991-5.
- Cogoni C. und Macino G.** 1997. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10233-8.
- Cogoni C. und Macino G.** 1999a. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**: 166-9.
- Cogoni C. und Macino G.** 1999b. Post-transcriptional gene silencing in *Neurospora* by a ReqQ DNA Helicase. *Science* **286**: 342-4.
- Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Rudd S., Angell S. und Baulcombe D.C.** 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-53

- Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T.H. und Baulcombe D.C.** 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* **20**: 2069-78.
- Day C.D., Lee E., Kobayashi J., Holappa L.D., Albert H. und Ow D.W.** 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* **14**: 2869-80.
- Dean C. und Schmidt R.** 1995. Plant genomes:a current molecular description. *Ann Rev Plant Phys* **46**: 395-418.
- De Carvalho F., Gheysen G., Kushnir S., Van Montagu M., Inze D., und Castresana C.** 1992. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *Embo J* **11**: 2595-602.
- Dean C., Sjodin C., Page T., Jones J. und Lister C.** 1992. Behaviour of the maize transposable element *Ac* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **2**: 69-81.
- Dehio C. und Schell J.** 1993. Stable expression of a single-copy rolA gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allows an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype. *Mol Gen Genet* **241**: 359-66.
- Dehio C. und Schell J.** 1994. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5538-42.
- Dellaporta S.L., Wood J. und Hicks J.B.** 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**: 19-21.
- Dieguez M.J., Vaucheret H., Paszkowski J. und Mittelsten Scheid O.** 1998. Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance. *Mol Gen Genet* **259**: 207-15.
- Di Serio F., Schob H., Iglesias A., Tarina C., Bouldoires E. und Meins F. Jr.** 2001. Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6506-10.
- Dorer D.R. und Henikoff S.** 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* **77**: 993-1002.

- Dorlhac de Borne F., Vincentz M., Chupeau Y. und Vaucheret H.** 1994. Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **243**: 613-21.
- Dougherty W.G. und Parks T.D.** 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol* **7**: 399-405.
- Duret L. und Mouchiroud D.** 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4482-87.
- Elmayan T., Balzergue S., Beon F., Bourdon V., Daubremet J., Guenet Y., Mourrain P., Palauqui J.C., Vernhettes S., Vialle T., Wostrickoff K. und Vaucheret H.** 1998. Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* **10**: 1747-58.
- Elmayan T. und Vaucheret H.** 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced posttranscriptionally. *Plant* . **9**: 787-97.
- English J.J., Mueller E. und Baulcombe D.C.** 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**: 179-88.
- Fagard M., Boutet S., Morel J.B., Bellini C. und Vaucheret H.** 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11650-4.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B.** 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-7.
- Feldmann K.A., Coury D.A. und Christianson M.L.** 1997. Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in Arabidopsis identifies genes important for gametophytic growth and development. *Genetics* **147**: 1411-22.
- Flavell R.B.** 1994. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3490-6.
- Forsbach A.** 2001. T-DNA Integration und Regulation von Transgenexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation an der Universität zu Köln*

- Gaudin V., Libault M., Pouteau S., Juul T., Zhao G., Lefebvre D. und Grandjean O.** 2001. Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development* **128**: 4847-58.
- Gielen J., De Beuckeleer M., Seurinck J., Deboeck F., De Greve H., Lemmers M., Van Montagu M. und Schell J.** 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. *Embo J* **3**: 835-46.
- Gils M.** 2000. Studien zur Expression von Transgenen: Gen Silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation an der Universität zu Köln*
- Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M. und Coupland G.** 1997. A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. *Nature* **386**: 44-51.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J.P., Hoepfner M.A. und Gagliano W.B.** 1998. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science* **280**: 446-50.
- Hamilton A.J. und Baulcombe D.C.** 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-2
- Han Y. und Grierson D.** 2002. Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J* **29**: 509-19.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Hartung F., Plchova H. und Puchta H.** 2000. Molecular characterisation of RecQ homologues in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4275-82.
- Hobbs S.L., Warkentin T.D. und DeLong C.M.** 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol* **21**: 17-26.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J. und Schilperoort R.A.** 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-80.
- Holtorf S., Apel K. und Bohlmann H.** 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **29**: 637-46.

- Holtorf H., Schob H., Kunz C., Waldvogel R. und Meins F. Jr.** 1999. Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and beta-1,3-glucanase genes involves increased RNA turnover-possible role for ribosome-independent RNA degradation. *Plant Cell* **11**: 471-84.
- Horsch R.B., Fry E.F., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. und Fraley R.T.** 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-31.
- Howden R., Park S.K., Moore J.M., Orme J., Grossniklaus U. und Twell D.** 1998. Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in Arabidopsis. *Genetics* **149**: 621-31.
- Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X. und Jacobsen S.E.** 2002. Control of CpNpGp DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* Advance online publication.
- Jacobsen S.E. und Meyerowitz E.M.** 1997. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in Arabidopsis. *Science* **277**: 1100-3.
- Jacobsen S.E., Running M.P. und Meyerowitz E.M.** 1999. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**: 5231-43.
- Jeddeloh J.A., Stokes T.L. und Richards E.J.** 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**: 94-7.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. und Bevan M.W.** 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**: 3901-7.
- Jones J.D.G., Dunsmuir P. und Bedbrook J.** 1985. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J* **4**: 2411-8
- Jones A.L., Thomas C.L. und Maule A.J.** 1998. De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *Embo J* **17**: 6385-93.
- Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J. und Baulcombe D.C.** 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**: 2291-301.
- Jones L., Ratcliff F. und Baulcombe D.C.** 2001. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* **11**: 747-57.

- Jones J.D., Shlumukov L., Carland F., English J., Scofield S.R., Bishop G.J. und Harrison K.** 1992. Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res* **1**: 285-97.
- Jones J.D.G., Carland F.M., Maliga P. und Dooner H.K.** 1989. Visual detection of transposition of the maize element *Activator* (Ac) in tobacco seedlings. *Science* **244**: 204-7.
- Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J., Que Q. und Napoli C.A.** 1996. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* **31**: 957-73.
- Karpen G.H.** 1994. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 281-91.
- Ketting R.F., Haverkamp T.H., van Luenen H.G. und Plasterk R.H.** 1999. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**: 133-41.
- Kim M., Canio W., Kessler S. und Sinha N.** 2001. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* **293**: 287-9.
- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K. und Jones J.D.** 1995. Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap Ds element in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet.* **249**: 357-65.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K. und Jenuwein T.** 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-20.
- Lechtenberg B.** 1999. Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*.
- Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M. und Dougherty W.G.** 1993. Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5**: 1749-59.
- Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S. und Jacobsen S.E.** 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**: 2077-80.

- Lucht J.M., Mauch-Mani B., Steiner H.Y., Metraux J.P., Ryals J., Hohn B.** 2002. Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat Genet.* **30**: 311-4.
- Luff B., Pawlowski L. und Bender J.** 1999. An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **3**: 505-11.
- Mallory A.C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L. und Vance V.B.** 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**: 571-83.
- Malpartida F., Zalacain M., Jimenez A. und Davies J.** 1983. Molecular cloning and expression in *streptomyces lividans* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochem Biophys Res Commun* **117**: 6-12
- Martienssen R.A. und Colot V.** 2001. DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi. *Science* **293**: 1070-74.
- Mathé C., Peresetsky A., Dehais P., van Montagu M. und Rouze P.** 1998. Classification of *Arabidopsis thaliana* gene sequences: clustering of coding sequences into two groups according to codon usage improves gene prediction. *J Mol Biol* **285**: 1977-91.
- Matsumura M., Katakura Y., Imanaka T. und Aiba S.** 1984. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by a plasmid pUB110. *J. Bacteriol* **160**: 413-20
- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J. und Matzke A.J.M.** 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J* **8**: 643-49.
- Matzke M., Matzke A.J. und Kooter J.M.** 2001. RNA: guiding gene silencing. *Science* **293**: 1080-3.
- McClintock B.** 1951. Chromosome organisation and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **16**: 13-47
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D. und Koornneef M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662, 679-82.

- Mengiste T., Amedeo P. und Paszkowski J.** 1997. High-efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* with a selectable marker gene regulated by the T-DNA 1' promoter. *Plant J* **12**: 945-48.
- Mette M.F., van der Winden J., Matzke M.A. und Matzke A.J.** 1999. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J* **18**: 241-8
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A. und Matzke A.J.** 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**: 5194-201.
- Metzlaff M., O'Dell M., Cluster P.D. und Flavell R.B.** 1997. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* **88**: 845-54.
- Migeon J.C., Garfinkel M.S. und Edgar B.A.** 1999. Cloning and characterization of penterpan, a novel *Drosophila* gene required for larval growth. *Mol Biol Cell* **10**:1733-44.
- Mittelsten Scheid O., Paszkowski J. und Potrykus I.** 1991. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **228**: 104-12
- Mittelsten-Scheid O., Afsar K. und Paszkowski J.** 1998. Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 632-37.
- Morel J.B., Mourrain P., Beclin C. und Vaucheret H.** 2000. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **10**: 1591-4.
- Morel J.B., Godon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. und Vaucheret H.** 2002. Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *Plant Cell* **14**: 629-39.
- Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T.A. und Vaucheret H.** 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-42.
- Müller C. und Leutz A.** 2001. Chromatin remodeling in development and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 167-74

- Napoli C., Lemieux C. und Jorgensen R.** 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-89.
- Nasr F., Bertauche N., Dufour M.E., Minet M. und Lacroute F.** 1994. Heterospecific cloning of *Arabidopsis thaliana* cDNAs by direct complementation of pyrimidine auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Cloning and sequence analysis of two cDNAs catalysing the second, fifth and sixth steps of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway. *Mol Gen Genet* **244**: 23-32.
- Ochman H., Gerber A.S.und Hartl D.L.** 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-23.
- Odell J.T., Nagy F. und Chua N.-H.** 1984. Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-12
- Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M. und Vaucheret H.** 1997. Systemic acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* **16**: 4738-45; *Erratum EMBO J* 1998 **17**: 2137
- Pal-Bhadra M., Bhadra U. und Birchler J.A.** 2002. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* **9**: 315-27.
- Parrish S., Fleenor J., Xu S., Mello C. und Fire A.** 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell*. **6**:1077-87.
- Park Y.D., Papp I., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J. und Matzke M.A.** 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J* **9**: 183-94.
- Perlak F.J., Fuchs R.L., Dean D.A., McPherson S.L. und Fischhoff D.A.** 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3324-8.
- Pröls F. und Meyer P.** 1992. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J* **2**: 465-75.

- Que Q., Wang H.-Y., English J. und Jorgensen R.** 1997. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in transgene coding sequence. *Plant Cell* **9**: 1357-68
- Ratcliff F., Harrison B.D. und Baulcombe D.C.** 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-60.
- Reuter G. und Spierer P.** 1992. Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* **14**: 605-12.
- Rouwental G.J., Mendes O., Wolbert E.J. und Douwe de Boer A.** 1997. Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Mol Biol* **33**: 989-99.
- Ruiz M.T., Voinnet O. und Baulcombe D.C.** 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-46.
- Russo V.E.A., Martienssen R.A. und Riggs A.D.** 1996. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1-5
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders P.R., Winter J.A., Barnason A.R., Rogers S.G. und Fraley R.T.** 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res* **15**: 1543-58.
- Schiebel W., Pelissier T., Riedel L., Thalmeir S., Schiebel R., Kempe D., Lottspeich F., Sanger H.L. und Wassenegger M.** 1998. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**: 2087-101.
- Schubert D.** 1999. Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit an der Universität zu Köln*
- Selker E.U.** 1999. Gene silencing: repeats that count. *Cell* **97**: 157-60.
- Shiu P.K., Raju N.B., Zickler D. und Metzberg R.L.** 2001. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**: 905-16.
- Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H. und Fire A.** 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-76.

- Smardon A., Spoerke J.M., Stacey S.C., Klein M.E., Mackin N. und Maine E.M.** 2000. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* **10**: 169-78.
- Southern E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-17.
- Stam M., de Bruin R., Kenter S., van der Hoorn R.A.L., van Blokland R., Mol J.N.M., und Kooter J.N.M.** 1997. Posttranscriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* **12**: 63-82.
- Stam M., Viterbo A., Mol J.N. und Kooter J.M.** 1998. Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *Mol Cell Biol* **18**: 6165-77.
- Tanzer M.W., Thompson W.F., Law M.D., Wernsman E.A. und Uknes S.** 1997. Characterisation of posttranscriptionally suppressed transgene expression that confers resistance to tobacco etch virus infection in tobacco. *Plant Cell* **9**: 1411-23.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** 2000. Sequence and analysis of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Tinland B.** 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* **1**: 178-184.
- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B. und Lindsey K.** 1994. Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant* **5**: 895-903.
- Ueki S. und Citovsky V.** 2001. RNA commutes to work: regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules. *BioEssays* **23**: 1087-90.
- Valvekens D., Van Montagu M. und V.L. M.** 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis* root explants using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5536-40.
- van Blokland R., Van der Geest N., Mol J.N.M.und Kooter J.M.** 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* **6**: 861-77.
- van der Krol A. R., Lenting P.E., Veenstra L., van der Meer I., Koes R.E., Gerats A.G.M., Mol J.N.M. und Stuitje A.R.** 1988. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-68.
- van Eldik G.J., Litiere K., Jacobs J.J., Van Montagu M. und Cornelissen M.** 1998. Silencing of beta-1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Res* **26**: 5176-81.

- Vaucheret H. und Fagard M.** 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**: 29-35.
- Vaucheret H., Beclin C., Elmayer T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Mourrain P., Palauqui J.C. und Vernhettes S.** 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* **16**: 651-59.
- Vielle-Calzada J.P., Thomas J., Spillane C., Coluccio A., Hoepfner M.A. und Grossniklaus U.** 1999. Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Dev* **13**: 2971-82.
- Voinnet O. und Baulcombe D.C.** 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553.
- Voinnet O., Vain P., Angell S. und Baulcombe D.C.** 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**: 177-87.
- Voinnet O., Lederer C. und Baulcombe D.C.** 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-67.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L. und Sanger H.L.** 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567-76.
- Waterhouse P.M., Graham M.W. und Wang M.B.** 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13959-64.
- Waterhouse P.M., Wang M. und Lough T.** 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-42.
- Wu-Scharf D., Jeong B., Zhang C. und Cerutti H.** 2000. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**: 1159-62.
- Xie Z., Fan B., Chen C. und Chen Z.** 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6516-21.
- Ye F. und Signer E.R.** 1996. RIGS (repeat-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10881-6.
- Zamore P.D.** 2001. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Struct. Biol.* **8**: 746-50.

8 Anmerkungen

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation in keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Priv.-Doz. Dr. Renate Schmidt betreut worden.

Lebenslauf

Name, Vorname	Schubert, Daniel
Adresse	AG Schmidt Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie 14424 Potsdam
Geburtsdatum	29.09.1973
Geburtsort	Köln
Eltern	Christa Schubert, Apothekerin Alfred Schubert, 1992 verstorben
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1981-1985	Albert-Schweitzer-Grundschule, Köln-Weiden
1985-1993	Georg-Büchner-Gymnasium, Köln-Weiden
Zivildienst	
Oktober 1993 – Oktober 1994	Evangelischer Sozialdienst Frechen
Studium	
Oktober 1994 - Juli 1999	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
September 1996	Diplomvorprüfung
Juli 1998	mündliche Diplomhauptprüfung
Juli 1998 – Juli 1999	Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft (Köln) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. R. Schmidt mit dem Thema: "Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in <i>Arabidopsis thaliana</i> "
September 1999 – Juli 2002	Dissertation am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft (Köln) und am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie (Golm) bei PD Dr. R. Schmidt, Promotion an der Universität zu Köln

Mein Dank

An Frau PD Dr. Renate Schmidt für die Betreuung meiner Arbeit, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, für sehr viele hilfreiche Diskussion, hervorragende Unterstützung und ein sehr spannendes Projekt.

An Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge für die bereitwillige Übernahme des zweiten Referenten.

An Herrn Prof. Dr. Wolfgang Werr für die bereitwillige Übernahme des Vorsitzes in meiner Prüfung.

An Herrn PD Dr. Karsten Fischer für die bereitwillige Übernahme des Beisitzes.

An Herrn Prof. Dr. Lothar Willmitzer und Herrn Prof. Dr. Mark Stitt für die Möglichkeit, meine Promotion im MPI für molekulare Pflanzenphysiologie beenden zu können.

Ganz besonders an Berthold Lechtenberg. Einen besseren Kollegen werde ich wohl nicht finden.

An Sandra Stegemann für sehr viel Hilfe im Labor und im Gewächshaus.

An Oliver Clarenz für die Sorge um unsere Pflanzen und dafür, dass Leverkusen nie Meister wird.

An meine ehemaligen Kollegen in Kölle, die „Silencer“ Mario Gils und Alexandra Forsbach und die „Mapper“ Adile Acarkan, Mathias Rossberg und Karine Boivin und die Praktikanten Christoph Paschke und Carolin Schmitz.

An die „MDLer“, ganz besonders Nicole Lewke und Sandra Wittke.

An die Gärtner-Teams in Köln und Golm, besonders Torsten Schulze, Linda Bartzeko, Britta Hausmann und Frank Eikelmann

An Burkhard Schulz und Üner Kolukisaoglu für reverse Genetik Screens und hilfreiche Diskussionen, Marcel Lafos für die Sorge um unsere Pflanzen.

An die Computergruppe in Golm, Dr. Wolf-Rüdiger Scheible und „Wum“ Streif für technische Unterstützung.

An meine Familie; meine Mutter für ihre immerwährende Unterstützung und ihre Hilfe, wann immer ich sie brauchte; meinem Vater dafür, dass er mir so viel Gutes mit auf den Weg gegeben hat. Ich hoffe sehr, dass er alles sieht und jetzt auch ein bisschen stolz sein kann.

An meine Steffi dafür, dass sie immer für mich da war, mich unterstützt hat und dafür gesorgt hat, dass mir die ganze harte Zeit leicht gefallen ist.

