

T-DNA Integration und Regulation von Transgenexpression in *Arabidopsis thaliana*

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

vorgelegt von

Alexandra Forsbach

aus Ratingen

Köln 2001

Berichterstatter: Dr. Klaus Palme
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2001

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungen	V
1	Einleitung	1
1.1	Die Integration von T-DNA in das Pflanzengenom	1
1.2	Variabilität der Transgen-Expression in Pflanzen	3
1.3	Transgen-Silencing: epigenetische Inaktivierung von Transgenen in Pflanzen	4
1.3.1	Studien und Modellvorstellungen zum transkriptionellen Gen-Silencing (TGS)	4
1.3.2	Studien und Modellvorstellungen zum post-transkriptionellen Gen-Silencing (PTGS)	6
1.3.3	Studien und Modellvorstellungen zur <i>antisense</i> Suppression	8
1.4	Das Untersuchungssystem	9
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	12
2.1.2	Medien	13
2.1.2.1	Medien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.2.2	Medien für die Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.1.2.3	Medien für die Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in axenischer Kultur	14
2.1.3	Verwendete Antibiotika- und Hormon-Konzentrationen	14
2.1.4	Oligonukleotide	15
2.1.5	Biologisches Material	16
2.1.5.1	Vektoren	16
2.1.5.2	Bakterienstämme	17
2.1.5.3	Pflanzenmaterial	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> Zellen	17
2.2.2	Anzuchtbedingungen der Pflanzen	18
2.2.3	Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfiltration von <i>A. thaliana</i> (<i>in planta</i> -Transformation)	18
2.2.4	Agrobakterien-vermittelte „Floral dip“ Infiltration von <i>A. thaliana</i> (<i>in planta</i> - Transformation)	19
2.2.5	Nomenklatur der transgenen <i>A. thaliana</i> Pflanzen	19
2.2.6	Sterilisation der Samenoberfläche, Wachstum und Selektion von <i>A. thaliana</i> Pflanzen	20
2.2.7	Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	20
2.2.8	Transfer von DNA auf eine Nylonmembran („Southern Blot“) und	

	Hybridisierung der Membran	21
2.2.9	Isolierung von RNA aus <i>A. thaliana</i>	22
2.2.10	Transfer von RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membran	22
2.2.11	Kartierung von T-DNA flankierenden genomischen <i>A. thaliana</i> Sequenzen	23
2.2.12	DNA-Sequenzierungen	24
2.2.13	Datenbankanalysen	27
2.2.14	β-Glucuronidase-Aktivitätstests	27
2.2.15	Bestimmung der relativen GFP Fluoreszenz	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Analyse und Etablierung der verwendeten Pflanzenlinien	30
3.1.1	Verwendete und erstellte T-DNA-Konstrukte	31
3.1.2	Stabilität der T-DNA Konstrukte in <i>A. tumefaciens</i>	33
3.1.3	Transformationen von <i>A. thaliana</i>	33
3.1.4	Analyse der <i>A. thaliana</i> Transformanten	34
3.1.4.1	Genetische Analyse transformierter <i>A. thaliana</i> Pflanzen	34
3.1.4.2	Molekulare Analyse transformierter <i>A. thaliana</i> Pflanzen mit einem T-DNA Locus	35
3.1.4.3	Molekulare Analyse transformierter <i>A. thaliana</i> Pflanzen mit zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus	39
3.2	Analyse der T-DNA Integration im Pflanzengenom	41
3.2.1	Kartierung der T-DNA flankierenden Bereiche von transgenen <i>A. thaliana</i> Pflanzen	41
3.2.2	Sequenzanalysen transgener Linien, deren T-DNA Integrationsorte für beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden konnten	43
3.2.2.1	Sequenzanalyse der T-DNA Bordersequenzen kartierter Transformanten	43
3.2.2.2	Sequenzanalyse des Verbindungsbereichs T-DNA/Pflanzen-DNA kartierter Transformanten	45
3.2.2.3	Sequenzanalyse des T-DNA Integrationsortes kartierter Transformanten	46
3.2.3	Sequenz- und molekulare Analyse transgener Linien, deren T-DNA Integrationsorte nur für einen flankierenden genomischen Bereich mittels PCR bestätigt werden konnten	47
3.2.3.1	Detektion von Ti-Plasmid Sequenzen	48
3.2.3.2	PCR Analyse zur Detektion von Transformanten mit zwei T-DNAs, die in invertierter Orientierung an einem Locus vorliegen	49
3.2.3.3	Detektion zusätzlicher unvollständiger T-DNA Borderbereiche mittels iPCR	50
3.2.3.4	Analyse von möglichen Translokationsereignissen	50
3.2.4	Chromosomale Verteilung von <i>A. thaliana</i> T-DNA Integrationen	50
3.2.4.1	Sequenzanalyse von T-DNA Integrationen in annotierten Genen des <i>Arabidopsis</i> -Genoms	51
3.2.4.2	Sequenzanalyse von T-DNA Insertionen in repetitiven Elementen des <i>Arabidopsis</i> Genoms	51
3.2.4.3	Chromosomale Verteilung der T-DNA Integrationen im <i>A. thaliana</i> Genom	53
3.3	Expressionsstudien der Reportergene	55

3.3.1	β-Glucuronidase Expressionsanalysen	56
3.3.1.1	Ermittlung der Vergleichbarkeit der quantitativen GUS-Aktivitätsmessung transgener Pflanzen in unterschiedlichen Versuchsreihen und Generationen	56
3.3.1.2	Expressionsanalysen der Pflanzen, deren T-DNAs repetitive Sequenzen in direkter Nachbarschaft zum 35S CaMV Promotor des β-Glucuronidase Reportergens enthalten	59
3.3.1.3	β-Glucuronidase Expressionsanalysen der für die T-DNA hemizygoten Pflanzenlinien der Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163 und GUS 1xr 164	63
3.3.1.4	Quantitative β-Glucuronidase Aktivitätstests von F1 Nachkommen der Kreuzungen verschiedener homozygoter GUS 1xr <i>repeat</i> T-DNA Pflanzenlinien	66
3.3.1.5	β-Glucuronidase Aktivitätstests der T-DNA Pflanzenlinie GUS 1xr rDNA 101	68
3.3.1.6	Quantitative β-Glucuronidase-Aktivitätstests von <i>A. thaliana</i> Pflanzen, die sowohl ein GUS-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors als auch ein promotorloses GUS-Transgen enthalten	70
3.3.1.7	β-Glucuronidase Expressionsanalysen der GUS S/AS f Transformanten und der F1 Nachkommen der Kreuzungen, deren T-DNAs das β-Glucuronidasegen in antisense und sense Orientierung tragen	75
3.3.2	Expressionsanalysen des GFP (<i>green fluorescent protein</i>) Transgens	80
3.3.2.1	Ermittlung der Vergleichbarkeit der relativen GFP Fluoreszenzanalysen für transgene Pflanzen unterschiedlicher Generationen und Versuchsreihen	81
3.3.2.2	GFP-Expressionsanalysen der für die T-DNAs mGFP 1xf und mGFP 1xr homo- und hemizygoten Pflanzen	82
3.3.2.3	Fluoreszenzanalysen der T-DNA Linie mGFP 1xr 127	85
3.3.3	Reportergenexpression und Kartierung der T-DNA Integration im Pflanzengenom	86
4	Diskussion	87
4.1	Die Etablierung der zur Analyse verwendeten <i>A. thaliana</i> Transformanten	87
4.1.1	Stabilität der verwendeten T-DNA Konstrukte in <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> und <i>A. thaliana</i>	87
4.1.2	Transformation von <i>A. thaliana</i>	87
4.1.3	Genetische und molekulare Analyse der T-DNA Transformanten	88
4.2	Die Analyse von T-DNA Integrationen im <i>A. thaliana</i> Genom	88
4.2.1	Molekulare Sequenzanalyse der T-DNA Integrationen in <i>A. thaliana</i>	91
4.2.2	Analyse der chromosomalen Verteilung integrierter T-DNAs	93
4.3	Die Analyse der Reportergenexpression	93
4.3.1	<i>A. thaliana</i> Transformanten, die vor dem 35S CaMV Promotor der Reportergenkassette 35S::GUS::ocs3' repetitive Elemente tragen, weisen eine einheitlich hohe Expression auf	93
4.3.2	Die GUS-Aktivität der für die T-DNA der Reportergenkassette <i>GUS 1xr repeat</i> hemizygoten Transformanten ist im Vergleich zu homozygoten um die Hälfte reduziert	95

4.3.3	Untersuchungen der Silencing-Phänomene von <i>A. thaliana</i> Transformanten, die mehr als zwei Kopien des GUS-Reportergens besitzen	96
4.3.4	Expressionsstudien des GFP (<i>green fluorescent protein</i>) Reportergens in <i>A. thaliana</i>	97
4.3.5	Expressionsstudien von Transformanten, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus aufweisen	98
4.3.6	Studien zur <i>antisense</i> Suppression in <i>A. thaliana</i>	99
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis	102
	Abstract	114
7	Anhang	I
8	Anmerkungen	XXII

Abkürzungen

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	radioaktiv markiertes Desoxycytosintriphosphat
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
b (kb, Mb)	Basen (Kilobasen, Megabasen)
bp (kbp, Mbp)	Basenpaare (Kilobasenpaare, Megabasenpaare)
BAP	6-Benzyl-Aminopurin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>copy</i> DNA
Ci	Curie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPT	Hygromycinphosphotransferase
Hyg	Hyromycin
IM	Infiltrationsmedium
iPCR	inverse Polymerase-Kettenreaktion
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB _x	Luria Medium mit Antibiotika versetzt
LB	Linke Grenze der T-DNA („Left Border“)
Lsg	Lösung
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS-Medium	Murashige & Skoog Medium
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronsäure Trihydrat
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40 (Polyethylenglycol-p-Isooctylphenyl-Ether)
NPT	Neomycinphosphotransferase

Abkürzungen

OD _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Rechte Grenze der T-DNA („Right Border“)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stammlsg.	Stammlösung
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
vergl.	vergleiche
v/v	Volumen/ Volumen
Vol.	Volumen
v/w	Gewicht (<i>weight</i>)/ Volumen
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Glucoronsäure
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Die Integration von T-DNA in das Pflanzengenom

Das Phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* besitzt die Fähigkeit, Gene in das Pflanzengenom einzubringen. Dieser horizontale Gentransfer wird in der biologischen Grundlagenforschung und der industriellen Anwendung verwendet, um Fremdgene in Pflanzen einzuführen. Der Gentransfer beruht auf den Funktionen der vir-Gene, die sich auf dem Ti-Plasmid (Ti = tumor inducing) von *Agrobacterium tumefaciens* befinden (Schell *et al.*, 1979).

Im Verlauf der *Agrobakterien* vermittelten Pflanzentransformation wird ein bestimmter Bereich des Ti-Plasmids in die Pflanzenzelle transferiert. Dieser Bereich, die T-DNA (transfer-DNA), wird innerhalb des Ti-Plasmides durch 24 bp direkte Sequenzwiederholungen (T-DNA Border) flankiert. *In vitro* Studien in *Agrobakterien* (Albright *et al.*, 1987, Wang *et al.*, 1987 und Dürrenberger *et al.*, 1989) zeigten, daß es im Verlauf der T-DNA Prozessierung und Integration durch stellen- und strangspezifisches Schneiden der linken und rechten T-DNA Border zur Erstellung eines Einzelstrangmoleküls (T-Strang) kommt. Die endonukleolytischen Schnittstellen befinden sich zwischen dem zweiten und dritten Nukleotid der 24 bp (Pansegrau und Lanka, 1991). Wird eine T-DNA vollständig integriert, so weist sie 2 bp der rechten und 22 bp der linken T-DNA Border auf. Im Verlauf des weiteren Integrationsprozesses erfährt das 5' Ende der T-DNA (die rechte T-DNA Border) eine Polarisierung durch Binden des VirD2 Proteins und es kommt zu einem 5' gerichteten T-DNA Transfer in das Pflanzengenom (Tinland *et al.*, 1995, zusammengefaßt in Tinland, 1996). Durch die Bindung des VirD2 Proteins wird eine Protektion des 5' T-DNA Endes gegen Nukleasen bedingte Degradierung vermutet. Da der linke Borderbereich nicht durch das VirD2 Protein geschützt ist, besteht die Annahme, daß der linke Borderbereich oft unvollständig in das Pflanzengenom integriert wird (Tinland *et al.*, 1995).

Studien der T-DNA Integration (Gheysen *et al.*, 1991, Matsumo *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991, Hiei *et al.*, 1994, van der Graaf *et al.*, 1996) in Tabak und *Arabidopsis* konnten für die linke T-DNA Border Deletionen innerhalb der 22 bp Bordersequenz sowie der angrenzenden T-DNA Bereiche ermitteln. Die rechte T-DNA Border wies in den meisten Fällen lediglich Deletionen von einem bzw. zwei Nukleotiden auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer vermuteten, präziseren Integration der rechten T-DNA Border in das Pflanzengenom (Tinland *et al.*, 1995). In einigen Fällen konnten zusätzlich zur T-DNA die angrenzenden Bereiche des Ti-Plasmides im Pflanzengenom nachgewiesen werden (Herman *et al.*, 1990, Mayerhofer *et al.*, 1991, Koncz *et al.*, 1998).

Die Integration der T-DNA in das Pflanzengenom erfolgte verteilt entlang der Chromosomen (Chyi *et al.*, 1986, Thomas *et al.*, 1994, Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997), wobei jedoch

eine Präferenz für transkribierte Regionen ermittelt wurde (Coates *et al.*, 1987, Koncz, *et al.*, 1989, 1994, Tinland, 1996, Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997).

Ein oder mehrere T-DNA Kopien können an einem oder verschiedenen Loci im Pflanzengenom vorkommen (Koncz *et al.*, 1989). Die Loci können vollständige und unvollständige T-DNAs beinhalten und die T-DNAs liegen teilweise in komplexen Strukturen vor (Jorgensen *et al.*, 1987, Koncz *et al.*, 1994, De Neve *et al.*, 1997). Generell besteht eine präferentielle Integration mehrerer T-DNAs an einem Locus (Depicker *et al.*, 1985, de Block und Debrouwer *et al.*, 1991 und De Neve *et al.*, 1997). Die Wahl des *Agrobakterien*-Stamms (Jorgensen *et al.*, 1987) und das zur Transformation eingesetzte Gewebe (Grevelding *et al.*, 1993) beeinflusst ebenfalls das T-DNA Integrationsmuster im Pflanzengenom.

Im Bereich der T-DNA Integrationsstelle kam es zu kleineren Deletionen (Gheysen *et al.*, 1991 und Mayerhofer *et al.*, 1991). In einigen Fällen konnten auch größere Rearrangements wie umfangreiche Deletionen oder Translokationen im Pflanzengenom nachgewiesen werden (Nacry *et al.*, 1998, Laufs *et al.*, 1999). Für den Übergang zwischen Pflanzen-DNA und T-DNA konnten in einigen Fällen zusätzliche Nukleotide (*filler DNA*) ermittelt werden. Solche Verbindungsbereiche werden als unpräzise bezeichnet (Matsumoto *et al.*, 1990, Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991). Zwischen den Sequenzen der Integrationsstelle im Pflanzengenom und der T-DNA wurden Mikrohomologien ermittelt. Dies führte zu Modellvorstellungen, daß die T-DNA Integration im Pflanzengenom auf dem Mechanismus der illegitimen Rekombination beruht (Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991, Ohba *et al.*, 1995).

Die bisherige Charakterisierung von T-DNA Integrationen wurde an einer geringen Anzahl transgener Linien, die z.T. komplexe T-DNA Strukturen beinhalteten, durchgeführt. Daher ist keine allgemeingültige Aussage über die Häufigkeit von Veränderungen der T-DNA und der Integrationsorte möglich. Ähnliches gilt für die Verteilung der Integrationsorte in Genen und repetitiven Elementen des Pflanzengenoms. Zur Ermittlung der die T-DNA flankierenden Sequenzen können die Methoden TAIL-PCR (*thermal asymmetric interlaced PCR*, Liu *et al.*, 1995) bzw. iPCR (Ochman *et al.*, 1993) herangezogen werden.

Das Einbringen von T-DNA in das Pflanzengenom wurde in der Pflanzenbiologie hauptsächlich zur Erstellung stabil integrierter Transgene verwendet. Sowohl monokotyledone (u.a. Reis) als auch dikotyledone Pflanzen (u.a. *Arabidopsis*, Tabak, *Petunia*, Tomate) sind transformierbar (zusammengefaßt in Hohn *et al.*, 1989).

Die Eigenschaft der T-DNAs, oft in transkribierte Bereiche zu inserieren, kann ausgenutzt werden, um Genfunktionen durch T-DNA Insertion zu zerstören (Yanofsky *et al.*, 1990). Die T-DNA Insertionsmutagenese wurde zu einem wichtigen Werkzeug zur Isolierung von Genen und der Analyse ihrer Funktion. In *Arabidopsis* ermöglicht die fast vollständige Abdeckung des Genoms mit T-DNA Insertionen die Methodik der reversen Genetik (Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997).

1.2 Variabilität der Transgen-Expression in Pflanzen

Die Einführung von Transgenen kann seit Beginn der achtziger Jahre stabil durch *Agrobakterien* vermittelte T-DNA Transformation in das Pflanzengenom erfolgen, wobei Integrationsort und Kopienzahl der T-DNA nicht gesteuert werden können. Die Bedeutung von transgenen Pflanzen nimmt sowohl für die Grundlagenforschung sowie für industrielle und landwirtschaftliche Anwendungen stetig zu. Daher ist es wünschenswert, Techniken zu entwickeln, die eine stabile und vorhersagbare Expression eines Gens in verschiedenen Genompositionen gewährleisten.

Untersuchungen zur Transgenexpression ermittelten starke Unterschiede zwischen verschiedenen Transformanten. GUS-Aktivitätsmessungen verschiedener Transformanten wichen um den Faktor 8600 (Topping *et al.*, 1991), 2500 (Holtorf *et al.*, 1995) bzw. 175 (Peach *et al.*, 1991) voneinander ab. Große Variabilität in der Höhe der Transgenexpression konnte mittels Northern Blot Analysen für weitere Transgene ermittelt werden (Jones *et al.*, 1985, An, 1986, Dean *et al.*, 1988, Shirsat *et al.*, 1989, Meza *et al.*, 2001).

Das Ergebnis der Untersuchung von Jakowitsch *et al.* (1999) zeigte, daß zusätzlich vorliegende partielle Transgenkopien sowie Vektor- oder T-DNA-Fragmente für eine instabile und reduzierte Transgenexpression verantwortlich waren. Eine Reduktion der Genexpression aufgrund von inversen Sequenzwiederholungen oder komplexen T-DNA Strukturen wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Linn *et al.*, 1992, Hobbs *et al.*, 1993, Finnegan und McElroy 1993, 1994, Fink und Bender, 1995, Stam *et al.*, 1998, zusammengefaßt in Selker 1999).

Eine Untersuchung von Day *et al.* (2000) in Tabak konnte zeigen, daß einige Transgene, die mit Hilfe des Cre-lox-Systems in die gleiche Genomposition eingebracht wurden, variable Expression aufwiesen. Es wurde festgestellt, daß die unterschiedliche Aktivität der Reportergene in Zusammenhang mit verschiedenen Transformationsexperimenten stand. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Gensilencing auch während der Transformation etabliert werden kann.

Einige Untersuchungen zeigten eine expressionsstabilisierende Wirkung von MAR-Sequenzen („Matrix-attached-regions“). Flankieren MARs transformierte Gene, so konnte über mehrere Generationen eine stabile und einheitliche Expression beobachtet werden (Allen *et al.*, 1996). MARs verschiedener Organismen konnten jedoch in Tabak Silencing der betreffenden Gene nicht verhindern (Vaucheret *et al.*, 1998).

1.3 Transgen-Silencing: epigenetische Inaktivierung von Transgenen in Pflanzen

Im Verlauf der Untersuchungen transgener Pflanzen zeigten sich in Ausnahmefällen unerwartete Phänomene, die eine variable Expression bis zu einer vollkommenen Abschaltung des Transgens beinhalten (zusammengefaßt in Flavell, 1994, Finnegan und McElroy, 1994). Dies war nicht durch eine Veränderung oder den Verlust der Nukleinsäuresequenz der betroffenen Gene zu erklären; es handelt sich somit um epigenetische Phänomene.

Generell wird Silencing von Transgenen in zwei Klassen eingeteilt. Die erste Klasse enthält das Phänomen der Positions-Effekt-Variation (PEV). PEV bezeichnet in *Drosophila* den Einfluß der chromosomalen Umgebung auf die Expression eines Gens. PEV wird beobachtet, wenn Gene aus euchromatischen Bereichen durch Translokationen oder Inversionen in die Nähe von oder in heterochromatische Genomdomänen transferiert werden (zusammengefaßt in Henikoff, 1998). Die zweite Klasse enthält das Phänomen des Homologie-abhängigen Gen-Silencings (HDGS – „homology-dependent gene silencing“), welches oft beim Vorliegen mehrerer Sequenzkopien im Pflanzengenom beobachtet wird. Die Modellvorstellung besagt, daß es zu Interaktionen zwischen homologen Sequenzen kommt (Stam *et al.*, 1997). Die häufig beobachtete inverse Korrelation zwischen Transgen-Kopienzahl (Linn *et al.*, 1990, Mittelsten-Scheid *et al.*, 1991, Assad *et al.*, 1993) und Expression des entsprechenden Transgens widersprach den Erwartungen und einer Studie von Hobbs *et al.* (1993), in der gezeigt wurde, daß eine Erhöhung der Transgen-Kopienzahl auch zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus führt.

Gen-Silencing kann durch Modulation der Transkription oder der mRNA Stabilität hervorgerufen werden. Daher wird zwischen transkriptionellem (TGS) und posttranskriptionellem (PTGS) Gen-Silencing unterschieden (Stam *et al.*, 1997). TGS ist im allgemeinen mit einer erhöhten meiotisch vererbaren Promotormethylierung assoziiert (Park *et al.*, 1996) und korreliert mit einer veränderten Chromatinstruktur (Ye und Signer, 1996). PTGS ist häufig mit einer meiotisch revertierbaren Methylierung der kodierenden Sequenzbereiche verbunden (Stam *et al.*, 1997, Depicker und van Montagu, 1997).

1.3.1 Studien und Modellvorstellungen zum transkriptionellen Gen-Silencing (TGS)

Transkriptionelles Silencing von Genen, die Homologien in Promotorregionen besitzen, wurde in *cis* beobachtet, wenn mehrere, z.T. deletierte Kopien eines Transgens an einem Locus im *A. thaliana* Pflanzengenom vorlagen (Assaad *et al.*, 1993). Der zur Transformation verwendete T-DNA Vektor enthielt mehrere zum Teil deletierte Wiederholungen des

Neomycinphosphotransferasegens (NPT), dessen Genprodukt transgenen Pflanzen Kanamycinresistenz verleiht. Mehrere T-DNAs integrierten an einem einzigen Locus und zeigten durch Rekombinationsereignisse strukturelle Veränderungen. In einem Fall entstand eine einzelne, vollständige Kopie des NPT Gens. Transgene Pflanzen, die diese einzelne, vollständige NPT Kopie trugen, besaßen Antibiotikaresistenz. Transgene Linien, die an einem Locus mehrere komplexe T-DNAs mit zumindest einer intakten NPT-Kopien besaßen, zeigten in jeder Generation eine hohe Anzahl Antibiotika sensibler Pflanzen. Die tandemartigen Sequenzwiederholungen der inaktivierten Loci führten zum Begriff des „*Repeat induced gene silencing*“ (RIGS). Neben einer DNA Methylierung der Promotorbereiche, konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber einer DNaseI und einer *Micrococcus* Nuklease Behandlung nachgewiesen werden, die auf eine Veränderung der Chromatinstruktur hindeutet (Ye und Signer, 1996).

Ein Modell zur Wirkungsweise von RIGS wurde durch Untersuchungen tandemartiger Transgenkonfigurationen in *Drosophila* von Dorer und Henikoff (1994) vorgeschlagen. Sie zeigten, daß einzeln vorliegende Transgene eine starke Variegation aufweisen, wenn sie in der Nähe oder in heterochromatischen Bereichen integriert vorliegen und dadurch PEV unterliegen. Heterochromatin flankiert die Centromere und enthält u.a. repetitive Elemente: in tandem organisierte Sequenzwiederholungen, Mikrosatelliten, Transposons und Retrotransposons. Variegierte Expression konnte jedoch auch beobachtet werden, wenn Transgene in tandemartiger oder invertierter Lage zueinander in euchromatischen Bereichen integriert vorlagen. Für diese Transgene konnte eine Korrelation zwischen der Variegationsstärke und der Anzahl repetitiver Transgene ermittelt werden. Die Modellvorstellung zur variegierten Expression repetitiver Transgene besagt, daß durch die Paarung der Sequenzwiederholungen eine Induktion von Heterochromatin erfolgt.

Die Kombination von aktiven Transgenkopien durch Kreuzung oder Transformation zeigten TGS Phänomene in *trans*. Durch die Einführung mehrerer T-DNAs, die unterschiedliche Resistenzgene trugen, kam es bei Verwendung des gleichen Promotors zum Verlust der Aktivität der Resistenzgene in transgenen Pflanzen (Matzke *et al.*, 1989, Matzke und Matzke 1990, 1991, 1993). Deletionsanalysen von Promotoren ergaben, daß eine Homologie von 90 bp ausreichend für TGS ist (Vaucheret, 1993).

In Tabak (Park *et al.*, 1996) konnten zwei inaktivierende Loci in Telomernähe lokalisiert werden, H2 und 271, die aus vielfachen Sequenzwiederholungen bestehen. Der H2 Locus besaß multiple Kopien des Nopalinsynthase-Promotors (pnos) und der Locus 271 enthielt mehrere Kopien des NPT-Gens unter der Kontrolle des CaMV 19S Promotors. Der Locus H2 war in der Lage jedes Transgen zu inaktivieren, welches unter der Kontrolle des pnos Promotors stand und der Locus 271 inaktivierte jedes Transgen, welches sich unter der Kontrolle des 35S oder 19S Promotors befand (Matzke *et al.*, 1994). Die Inaktivierung war mit einer Hypermethylierung der Promotorbereiche verbunden und durch „*run-off*“ Transkriptions-Experimente wurde belegt, daß es sich um TGS handelte (Park *et al.*, 1996).

Modellvorstellungen besagen, daß die Interaktion homologer Sequenzen durch direkte DNA-DNA Paarung die *trans*-wirkenden Methylierungs- und Silencingsignale und damit TGS

vermitteln. Signale für eine *de novo*-Methylierung in *cis* können dabei an einen transgenen Locus (Stam *et al.*, 1998) oder an flankierende Sequenzen (Pröls und Meyer, 1992) gebunden sein.

In einer Studie von Mette *et al.* (1999) konnte die Signaleigenschaft doppelsträngiger RNA (dsRNA) im Zusammenhang mit TGS nachgewiesen werden. Promotorsequenzen wurden unter die Kontrolle eines anderen Promotors gestellt, um dsRNA der Promotorbereiche zu erzeugen. Die dsRNA war nachweisbar und konnte *de novo* Methylierungen auf einen korrespondierenden Transgenpromotor übertragen und dort TGS auslösen. Es konnten auch 21-25 nt *sense* und *antisense* RNAs (Hamilton *et al.*, 1998), die Homologie zum Promotor aufwiesen, festgestellt werden. Vergleichbare kleine RNA Moleküle wurden im Zusammenhang mit PTGS (Hamilton *et al.*, 1998, Waterhouse *et al.*, 1998) nachgewiesen. Daher könnten sowohl TGS als auch PTGS durch vergleichbare Moleküle vermittelt werden.

TGS ist nicht nur an multiple Kopien gebunden, sondern konnte auch für ein Transgen, welches in Einzelkopie vorlag, nachgewiesen werden. In einer Studie von Pröls und Meyer (1992) wurde die Inaktivierung des *AI*-Transgens (kodiert für das Enzym Dihydro-flavonol-4-Reduktase) aus Mais in *Petunia* nachgewiesen, welches in der Nachbarschaft von Sequenzen mit hohem Methylierungsgrad lokalisiert war. Im Bereich des Transgen-Promotors bestand ausgeprägte Methylierung. Daher wurde vermutet, daß die Methylierung der genomischen Umgebung auf das Transgen ausgeweitet wurde. Dies ist vergleichbar mit der Ausbreitung von Heterochromatin, wie es in *Drosophila* vermutet wird. Es wird vermutet, daß Transgene, die sich in der Nähe heterochromatischer Domänen befinden, durch die Ausweitung von Heterochromatin in dieses hineingezogen werden (zusammengefaßt in Henikoff, 1998).

1.3.2 Studien und Modellvorstellungen zum post-transkriptionellen Gen-Silencing (PTGS)

Posttranskriptionelles Gen-Silencing geht mit einer Reduktion der Gen-Aktivität durch sequenzspezifische Degradierung der mRNA einher und ist häufig mit einer Methylierung der kodierenden Sequenz verbunden. PTGS wurde häufig beobachtet, wenn die Transgene unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors standen, der hohe Expression vermittelt. PTGS wurde auch bei Transgenen gefunden, die keine Sequenzhomologie zu endogenen Genen aufweisen (Hobbs *et al.*, 1993, Dehio und Schell, 1994, Elmayan und Vaucheret, 1996, English *et al.*, 1996).

PTGS wurde in einer Studie von Dehio und Schell (1994) durch die Einführung des *rolB* Gens aus *Agrobacterium rhizogenes* in *A. thaliana* beobachtet. Transgene Pflanzen, die eine Kopie des *rolB* Gen exprimiert an einem Locus aufwiesen, zeigten einen visuell erfaßbaren Phänotyp. Eine Transgen-Inaktivierung wurde durch die Reversion der betreffenden Pflanzen zum Wildtyp-Phänotyp deutlich. Die Frequenz der *rolB* Geninaktivierung war abhängig von der Zahl der integrierten Transgene und der Stärke des verwendeten Promotors. Zudem konnte für eine Transformante, die die *rolB* Gene homozygot trug, eine höhere Inaktivierungsfrequenz als für

die entsprechenden hemizygoten Pflanzen ermittelt werden. Dieses Expressions- und Inaktivierungsverhalten zeigte sich in jeder Generation erneut. Daraus wurde geschlossen, daß die Inaktivierung des Gens im Verlauf der Meiose aufgehoben wird. Es wurde gezeigt, daß es sich bei dieser Form des Gen-Silencing um PTGS handelt.

Das Einbringen von Transgenen, die Sequenzhomologien zu endogenen Genen aufweisen, kann zum koordinierten Silencing des Transgens und des endogenen Gens führen. Dieses Phänomen wird als Cosuppression bezeichnet und wurde erstmals in *Petunia* beobachtet. Durch die Einführung zusätzlicher Kopien des Chalkonsynthase (*Chs*) Gens kam es zu einer Inaktivierung der Transgene und der endogenen *Chs*-Gene (Jorgensen *et al.*, 1990, Napoli *et al.*, 1990, van der Krol *et al.*, 1990).

Grundlage für die posttranskriptionelle Gen-Inaktivierung ist der selektive Abbau der mRNA im Cytosol. Untersuchungen ermittelten einen Zusammenhang zwischen der Menge der transkribierten RNA und deren Abbau bei Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes („*Threshold*“-Hypothese, Lindbo *et al.*, 1993, Dehio und Schell *et al.*, 1994, Metzloff *et al.*, 1997, Que *et al.*, 1997, Elmayan *et al.*, 1998, Vaucheret *et al.*, 1998a). Diese These konnte jedoch in einigen Untersuchungen nicht bestätigt werden (English *et al.*, 1996). In einem Fall konnte sogar durch ein Transgen ohne Promotor Cosuppression ausgelöst werden (van Blokland *et al.*, 1994). Daher scheint die Menge der transkribierten mRNA nicht in allen Fällen für PTGS verantwortlich zu sein. Zur Erklärung dieser Fälle wurde postuliert, daß es zu einer direkten DNA-DNA Wechselwirkung der homologen Sequenzbereiche kommt. Als Folge dieser Paarung wurde die Produktion aberranter RNA Moleküle und eine Methylierung der kodierenden Sequenzbereiche vorgeschlagen (zusammengefaßt in Selker 1997, 1998).

Es wird vermutet, daß kleine aberrante RNAs mit der mRNA des Transgens hybridisieren, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) bilden und diese dadurch für eine Degradierung durch doppelstrangspezifische RNasen markieren. In verschiedenen Pflanzenspezies wurde im Zusammenhang mit PTGS das Vorliegen von kleinen 21-25 bp langen *sense* und *antisense* RNA Molekülen nachgewiesen (Hamilton *et al.*, 1998, Waterhouse *et al.*, 1998, Chuang *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus der Initiation von PTGS ist unbekannt. Ein Modell, das die Synthese der dsRNA durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) beinhaltet, wurde als zentraler Funktionsmechanismus in mehreren Untersuchungen dargestellt (Jorgensen *et al.*, 1998, Wassenegger *et al.*, 1994, Wassenegger und Pélissier, 1998, Waterhouse *et al.*, 1998).

In Tomate konnte ein Gen identifiziert werden, welches für eine RdRP kodiert (Schiebel *et al.*, 1998). In *Arabidopsis* (Dalmay *et al.*, 2000 und Mourrain *et al.*, 2000), *Neurospora crassa* (Cogoni und Macino, 1999) und *Caenorhabditis elegans* (Smardon *et al.*, 2000) konnten mittels Mutanten Gene identifiziert werden, die Sequenzhomologie zum RdRP-Gen aus Tomate aufwiesen. In den Mutanten war PTGS nicht mehr zu beobachten, damit wurde eindeutig die Rolle der RdRP bei PTGS Prozessen belegt.

Die systemische, sequenzspezifische Ausbreitung des PTGS wurde in Studien von Palauqui *et al.* (1997) und Voinnet und Baulcombe (1997) in Tabak untersucht. Es konnte eine Ausbreitung

über große Distanzen nachgewiesen werden. Das Signalmolekül konnte noch nicht ermittelt werden.

Verschiedene Untersuchungen legten den Schluß nahe, daß es sich bei PTGS um einen pflanzlichen Mechanismus zur Virusabwehr handelt (Voinnet *et al.*, 1997, Waterhouse *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 1999).

1.3.3 Studien und Modellvorstellungen zur *antisense* Suppression

Die *antisense* Suppression wurde in der Pflanzenbiologie vielfach genutzt, um spezifisch die Expression endogener Gene zu reduzieren. Sie wurde eingesetzt, um Genfunktionen beispielsweise in metabolischen Synthesewegen oder der Pflanzenentwicklung zu analysieren. Weitere Ziele der *antisense* Suppression waren die Erzeugung von Mutanten und eine Ertragssteigerung im Nutzpflanzenanbau (zusammengefaßt in Bourque, 1995).

Doch nicht immer zeigte sich der gewünschte Effekt, eine vollständige Ausschaltung der endogenen Genexpression, durch *antisense* Transgene. In *Petunia* (Napoli *et al.*, 1990, van Blokland *et al.*, 1990, von der Krol *et al.*, 1990) wurde durch die Einführung von Chalkonsynthase(*Chs*)-*antisense* Genkonstrukten der Einfluß auf das endogene *Chs* Gen untersucht. Es konnte keine Korrelation zwischen der Zahl an eingeführten Chalkonsynthase *antisense* Genkopien und der Menge der vorhandenen *antisense* mRNA ermittelt werden. Diese Untersuchungen zur *antisense* Suppression von Genen ergaben weiterhin, daß Transformanten mit einem vergleichbaren Niveau an *antisense* RNA unterschiedliche Phänotypen zeigten, die auf geringe bis starke Reduktion der *Chs*-Expression zurückzuführen waren. Interessanterweise konnten einige Transformanten mit einem sehr geringen Niveau an *antisense* RNA starkes Silencing hervorrufen. Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der *antisense* Suppression und der *antisense* Transkriptmenge bzw. der *antisense* Kopienzahl konnte somit nicht ermittelt werden (van der Krol *et al.*, 1990, Hall *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu anderen Untersuchungen (Smith *et al.*, 1990). Spätere Untersuchungen (Jorgensen *et al.*, 1996, Que *et al.*, 1998) ermittelten anhand von Phänotypen eine Korrelation zwischen der Anzahl der Transgene in *antisense* Orientierung und der Stärke der *antisense* Suppression. Eine solche Korrelation wurde ebenfalls für Transgene in *sense* Orientierung und Cosuppression ermittelt. *Chs* Silencing Phänotypen wurden in Studien zur Cosuppression beschrieben (u.a. Napoli *et al.*, 1990, Stam *et al.*, 1997, Atkinson *et al.*, 1998). Durch das Silencing des *Chs*-Gens kam es zu einer Unterdrückung der Blütenfarbe. Einzelkopie-Transgene in *antisense* Orientierung riefen in *Petunia* im Vergleich zu Einzelkopie-*sense*-Transgenen ein wesentlich stärkeres Silencing hervor. Die beobachteten Phänotypen der *Chs* Inaktivierung durch *antisense Chs* Transgene waren mit den Phänotypen der *Chs* Inaktivierung durch *Chs* Transgene, deren T-DNAs in invertierter Orientierung vorlagen, vergleichbar. *Chs* Transgene, deren T-DNAs in invertierter Orientierung vorliegen, zeigten stärkere Cosuppression

als Einzelkopie-*Chs*-Transgene (Jorgensen *et al.*, 1996, Que *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zur *antisense* Suppression stehen in Übereinstimmung mit Daten von Waterhouse *et al.* (1998) und Wang *et al.* (2000). Aufgrund der Ähnlichkeit der *Chs* Phänotypen für *antisense* Suppression und PTGS, wurden vergleichbare mechanistische Modellvorstellungen angenommen, die eine DNA-DNA Paarung oder RNA-DNA Paarung beinhalten. Eine koordinierte Eliminierung von *sense*- und *antisense*-RNAs wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen (Hall *et al.*, 1993, Hamilton *et al.*, 1990, Sheedy *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1988).

1.4 Das Untersuchungssystem

Aus den vorangegangenen Darstellungen wird deutlich, daß die Einführung von Transgenen mittels *Agrobakterien* vermittelter Transformationsmethoden zu einer großen Variabilität der Transgen-Expression führt, der verschiedene Phänomene zugrunde liegen können.

Das in dieser Arbeit verwendete Untersuchungssystem hatte zum Ziel, eine klar definierte Struktur und Anzahl bestimmter Reportergene in verschiedenen Genompositionen zu etablieren und zu Expressionsanalysen heranzuziehen. Dadurch können Silencing-Phänomene, denen unvollständige und komplexe T-DNA Integrationen zugrunde liegen, ausgeschlossen werden.

Für diese Untersuchung wurde der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* verwendet, der problemlos zu transformieren ist. Aufgrund der kurzen Generationszeit von ca. sechs bis acht Wochen sowie einer Produktion von bis zu 10.000 Samen pro Pflanze und dem geringen Platzbedarf (Meyerowitz, 1989) besitzt diese Pflanze gute Eigenschaften für genetische Untersuchungen. Die Befruchtung erfolgt normalerweise durch Selbstbestäubung; es können jedoch ohne größeren Aufwand Kreuzungen durchgeführt werden. Mit einer Genomgröße von 125 Mb besitzt *A. thaliana* ein kleines Genom, welches sich durch einen geringen Anteil repetitiver mobiler Elemente auszeichnet (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Die fast vollständige Abdeckung des *Arabidopsis*-Genoms mit T-DNA und Transposon-Insertionen ermöglicht Untersuchungsmöglichkeiten der reversen Genetik (zusammengefaßt in Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997), um Genfunktionen zu identifizieren.

Das Genom ist mit Ausnahme der repetitiven Sequenzen vollständig sequenziert (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) und zudem existieren für alle fünf Chromosomen molekulare Marker-, YAC- und BAC-Contig-Karten (zusammengefaßt in Schmidt, 1998). Ermittelte, die T-DNA flankierende Sequenzen können daher problemlos aufgrund von Homologieuntersuchungen den Chromosomenkarten zugeordnet werden. Das Genom ist vollständig annotiert. Es wurde eine sehr hohe Gendichte ermittelt, durchschnittlich wird alle 4,5 kb ein Gen gefunden (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Damit kann für mittels Sequenz kartierte T-DNA-Integrationen untersucht werden, ob sie in Genen oder in der Nachbarschaft repetitiver Elemente vorliegen.

Das Heterochromatin der Centromerregionen in *A. thaliana* enthält hoch repetitive, in tandem organisierte Elemente, 5S rDNA Sequenzen und eine Vielzahl mobiler Elemente. Innerhalb des Heterochromatins existiert nur eine geringe Anzahl an Genen, für die jedoch Expression nachweisbar ist (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Zwei Familien repetitiver Elemente in Centromerregionen weisen eine Größe von 180 bp bzw. 500 bp auf (Marinez-Zapater *et al.*, 1986, Simoens *et al.*, 1988). Diese besitzen 3100-5500 (180 bp) bzw. 280-560 (500 bp) Kopien im Genom und sind tandemartig in Bereichen von 50 kb oder mehr organisiert. Eine Sequenzhomologie zwischen diesen repetitiven Elementen besteht, da das 500 bp Fragment aus zwei flankierenden 180 bp Sequenzen und einem zentralen degenerierten telomerähnlichen Fragment besteht. In den Centromerregionen konnten in *A. thaliana* weiterhin verteilt organisierte repetitive Elemente detektiert werden, beispielsweise die Familien 163 und 164 (Thompson *et al.*, 1996), die eine Kopienzahl von 90 bzw. 50 aufweisen. Repetitive Elemente außerhalb der Centromerbereiche wurden in den NORs (Nukleolus organisierende Regionen) der *A. thaliana* Chromosomen detektiert. Die Basiseinheit dieser repetitiven Elemente weist eine Länge von 10,0-10,5 kb auf. Sie besteht aus 18S-5,8S-25S rRNA Genen und einem intergenischen Bereich (*SalI* repetitive Elemente) (Gruendler *et al.*, 1991). Die Kopienzahl im Genom beträgt 570-750 (Pruitt und Meyerowitz, 1986).

Ähnlich umfangreiche Untersuchungen zur Genomstruktur liegen im Pflanzenreich nur für *Arabidopsis thaliana* vor. Damit ist es in dieser Art möglich, Untersuchungen zum Einfluß repetitiver Elemente auf die Transgenexpression durchzuführen. Pflanzenspezies wie *Petunia* oder Tabak, die zu Untersuchungen der Transgenexpression verwendet wurden (s. vorherige Abschnitte), bieten diese Vorteile für die Analyse nicht.

In vorangegangenen Studien konnte in *A. thaliana* eine eindeutige Korrelation zwischen der Transgenkopienzahl des β -Glucuronidasegens (GUS) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors und dessen Expression ermittelt werden. Alle untersuchten Pflanzen, die zwei Kopien des GUS-Gens trugen, zeigten eine einheitlich hohe GUS-Expression. Transgene Linien, die drei oder mehr Kopien des GUS-Gens trugen, wiesen hingegen Gensilencing auf. Homozygote Pflanzen, deren T-DNA die GUS-Reportergenkassette in zweifacher Kopie enthielt (GUS 2x), besaßen vier Kopien des GUS-Gens und die Untersuchung verschiedener isogener Pflanzen zeigte eine Variabilität der Genexpression. Einige Pflanzen wiesen hohe und andere niedrige Enzymaktivität auf, die im Vergleich zu Pflanzen mit zwei Kopien des GUS-Gens bis zu 1000fach verringert war. Enthielten die transgenen Pflanzen in ihrer T-DNA drei Kopien der GUS-Reportergenkassette (GUS 3x), besaßen homozygote sechs und hemizygoten drei Kopien des GUS-Gens. Im Vergleich zu transgenen Pflanzen mit zwei Kopien des GUS-Gens konnte eine bis zu 1000fache Verringerung der GUS-Aktivität ermittelt werden. Weiterhin zeigten der Vergleich einzelner Pflanzen einer transgenen Linie eine uneinheitliche Enzymaktivität. Es wurde ein posttranskriptioneller Mechanismus der Geninaktivierung vorgeschlagen (M. Gils, 2000, D. Schubert, 1999).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das in dieser Arbeit verwendete Untersuchungssystem sollte zur Ermittlung von Faktoren, die die Regulation der Transgenexpression in *Arabidopsis thaliana* beeinflussen, beitragen.

Die Etablierung von Einzelkopie T-DNA Linien und die detaillierte Charakterisierung und Kartierung der T-DNA Integrationen, sollte die Analyse der Expression verschiedener Reportergene in unterschiedlichen Genompositionen ermöglichen. Weiterhin sollte eine Analyse der T-DNA Insertionen Aufschluß darüber geben, in welchem Ausmaß in transgenen Linien mit einer T-DNA Kopie Veränderungen der Borderbereiche oder der Integrationsstelle im Pflanzengenom zu beobachten sind.

Es sollte systematisch untersucht werden, ob repetitive Elemente, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Reportergen vorliegen, die Expressionshöhe dieses Transgens beeinflussen.

Transgene *Arabidopsis*linien, in denen drei oder mehr Kopien des β -Glucuronidasegens unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors vorliegen, zeigen post-transkriptionelles Gen-Silencing (B. Lechtenberg, 1999; D. Schubert, 1999; M. Gils, 2000). Es sollte geklärt werden, ob Silencing durch die Menge an Transkript induziert wird oder ob DNA-DNA Wechselwirkungen eine auslösende Rolle spielen. Dazu wurden promotorlose Kopien des GUS-Gens erstellt und in transgene Pflanzen eingebracht, die verschiedene Anzahlen von GUS-Reportergenen unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors besaßen.

Weiterhin sollte ein systematischer Vergleich der *antisense* Suppression und des post-transkriptionellen Gen-Silencing in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

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
Difo Laboratories, USA:	Bacto-Agar, Bacto Trypton, Hefe-Extrakt, Pepton, Rindfleischextrakt
Duchefa, Haarlem, Niederlande:	6-Benzyl-Aminopurin, Chloramphenicol, Diethylpyruvylcarbonat, Hygromycin B, Kanamycin, 4-MUG, MS Medium M0222, Rifampicin, Streptomycin, Tetracyclin, X-Gluc
Fluka, Schweiz:	Formamid
Gibco BRL, USA:	Agarose, Oligonukleotide, Taq-Polymerase, Tris
Hartmann:	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP
JT Baker, Holland:	Borsäure
Life Technology:	BSA, Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerase (Klenow-Fragment), DNA-Längenstandard (GeneRuler TM 1kb DNA Leiter; <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> gespaltene λ -DNA), λ -DNA, dNTPs
Metabion:	Oligonukleotide
New England Biolabs, USA:	T4-DNA Ligase (2000000 U/ml), <i>Bst</i> YI
OSI Specialities Inc., USA:	Silvet L-77
Pall, USA:	Biodyne A-Membran
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen:	peqGOLD RNA Pure TM
Pharmacia, Freiburg:	Ficoll
Roche, Mannheim:	ATP, Enzyme, 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., St. Louis USA:	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.

2.1.2 Medien

2.1.2.1 Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht erfolgte bei 37°C ÜN.

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

2.1.2.2 Medien für die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht erfolgte mindestens 2 Tage bei 28°C (Vervliet *et al.*, 1975).

YEB:	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
IM:	0,23% (w/v) MS-Medium 1% (w/v) Saccharose 10 ml/l 100 x B5 Vitamine (100 mg/l Nicotinsäure, 1 g/l Thiamin-HCl, 100 mg/l Pyridoxin-HCl, 10 g/l Myo-Inositol, 200 mg/l Glycin in H ₂ O _{bidest} (steril filtrieren)) pH 5,8 mit KOH nach dem Autoklavieren hinzugeben:

0,01 mg/l 6-Benzyl-Aminopurin
0,005% (v/v) Silvet L-77

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

Die Anzucht erfolgte in axenischer Kultur bei 18°C.

MS-Medium (M0222) wurde von der Firma Duchefa bezogen (Murashige und Skoog, 1962) und mit 9 g/l Bacto-Agar versetzt. Die entsprechenden Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

2MS:	0,46% (w/v) MS-Medium (pH 6,0) mit 2% Saccharose
AM:	0,23% (w/v) MS-Medium (pH 6,0) mit 1% Saccharose
OM:	0,23% (w/v) MS-Medium (pH 5,7)
AG:	0,46% (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

2.1.3 Verwendete Antibiotika- und Hormon-Konzentrationen

Für Selektionsexperimente wurden folgende Antibiotika- und Hormon-Konzentrationen verwendet:

in Bakterienkulturmedien:

Ampicillin:	100 µg/ml (Stammlösung 100 mg/ml in DMSO)
Rifampicin:	100 µg/ml (Stammlösung 1 mg/ml in DMSO)
Streptomycin:	200 µg/ml (Stammlösung 25 mg/ml in H ₂ O _{bidest} gelöst, steril filtriert)
Tetracyclin:	1 µg/ml (zur Selektion von <i>E. coli</i>) 10 µg/ml (zur Selektion von <i>A. tumefaciens</i>) (Stammlösung 5 mg/ml in Ethanol gelöst)

in Pflanzenselektionsmedien:

Claforan:	200 µg/ml (Stammlösung 50 mg/ml)
Kanamycin:	50 µg/ml (Stammlösung 50 mg/ml)
Vancomycin:	500 µg/ml (Stammlösung 50 mg/ml)

Claforan, Kanamycin, Streptomycin und Vancomycin wurden in H₂O_{bidest} gelöst und steril filtriert.

2.1.4 Oligonukleotide

GUS-Gen:	GUS A:	5'-GGCAACGTCTGGTATCAG-3'
	GUS B:	5'-CCTGTAAGTGCGCTTGCTGAG-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 950 bp	
GFP-Gen:	GFP A:	5'-CGATTGAAGGAGCCACTCAG-3'
	GFP B:	5'-CAAGAAGGACCATGTGGTCTC-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 700 bp	
HPT-Gen:	HPT 1:	5'-GACCTGATGCAGCTCTCGGA-3'
	HPT 2:	5'-CGCACTGACGGTGTCGTCCA-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 500 bp	
NPT-Gen:	NPT 1:	5'-CTACCTAACGTGCGTCCAAG-3'
	NPT 2:	5'-CCGCTCAGAAGAAGTTCGTC-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 750 bp	
RB Border:	RBB:	5'-GCCAGTCAGCATCATCACAC-3'
	RBout:	5'-GACGGCAATTTTCGATGATGCAG-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 1050 bp	
LB Border:	LBB:	5'-CGACGTGTCTACATTCACGTC-3'
	NPTout:	5'-CATCAGAGCAGCCGATTGTCT-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 750 bp	
T-DNA LB Border:	LB1c:	5'-TGGGTATCTGGGAATGGCGAAATC-3'
	Ti-Plasmid LB:	5'-GCCTCGATCAGCTCTGCACTCGC-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 650 bp	
T-DNA RB Border:	RB00:	5'-GTGGACCCTTGAGGAAACTGGTAG-3'
	Ti-Plasmid RB:	5'-GCATCAGCGTCATTCAGCAATCTTC-3'
	erwartete Produktlänge: ca. 800 bp	
Aktin:	ACTIN-FOR:	5'-TGTTGGTGATGAAGCACAATCC-3'
	ACTIN-REV:	5'-CTCTGCTGTTGTGGTGAACATG-3'
	Die Oligonukleotide binden an zwei Aktine (An <i>et al.</i> , 1996). erwartete Produktlänge der Aktine 2 und 8: ca. 700 bp	

In Abb. 2.1 und Abb. 2.2 sind die für die iPCR verwendeten Oligonukleotide dargestellt.

RB Border	RB00:	5'-GTGGACCCTTGAGGAAACTGGTAG-3'
	iPCRf1:	5'-CGGTGAGTAATATTGTACGGCTAAG-3'
	M13iPCR:	5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGA-3'
	iPCRr1:	5'-CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG-3'
	RB2:	5'-GCCAATTTGGCCTGTAGACCTCA-3'
	Weiterhin wurden die Primer RBout, HPT1 und HPT2 verwendet.	
LB Border	LB5:	5'-GGTACTATGAGTAACGACTAGG-3'
	LB4:	5'-GCTGCCTAGCATTAACAGC-3'

NOSout: 5'-GCGGTTCTGTCAGTTCCAAACG-3'
LBB: 5'-CGACGTGTCTACATTCACGTC-3'
NPTiPCR: 5'-GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCC-3'
NOS-NPT: 5'-GTTTGGAAGTACAGAACC-3'

Weiterhin wurden die Primer LB1c und NPTout verwendet (s.o.).

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 Vektoren

Zur Herstellung von Pflanzentransformationsvektoren wurden Hochkopienzahl- und T-DNA-Plasmide (Jones *et al.*, 1992) verwendet.

Die Hochkopienzahl-Plasmide, in denen das β -Glucuronidase Gens (GUS) kloniert ist, sind Derivate des Vektors pUC118 (Jones *et al.*, 1992). Die Hochkopienzahl-Plasmide, in denen das mGFP-Gen (*modified green fluorescent protein*) vorliegt, sind Derivate des Vektors pBI121 (Haseloff, *et al.*, 1997). Diese Vektoren tragen eine Ampicillin-Resistenz.

Die binären T-DNA Plasmide sind Derivate des Vektors SLJ7292 (Jones *et al.*; 1992). Sie besitzen Tetracyclin-Resistenz.

verwendete Hochkopienzahl-Plasmide: SLJGUS (S. Bahadur, unveröffentlicht)
pSP73HK-GUSL1(1) (S. Bahadur, unveröffentlicht)

erstellte Hochkopienzahl-Plasmide: SLJGUS AS
pSP73HK-GUSL1(1) GUS AS

verwendete binäre Vektoren: SLJDsHPT-GUS(Q5) (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJDsHPT (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJDsHPT-DXhoI (SPT8, GUSL1) (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJGUS-pAL (M. Gils, unveröffentlicht)
SLJGUS-163 (M. Gils, unveröffentlicht)
SLJGUS-164 (M. Gils, unveröffentlicht)
SLJGUS-501 (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJGUS-502 (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJGUS-rDNA (S. Bahadur, unveröffentlicht)
SLJmGFP-ER f (M. Gils, unveröffentlicht)
SLJmGFP-ER r (M. Gils, unveröffentlicht)

erstellte binäre Vektoren: SLJDsHPT-GUS (Q5) $\Delta XhoI$
SLJ Δ GUS 2a
SLJDsHPT GUS AS r
SLJDsHPT GUS S/AS f

2.1.5.2 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983): Dieser Stamm wurde zur Vermehrung und Erhaltung der Hochkopienzahl-Plasmide verwendet.

E. coli SURETM (Stratagene): Die Erhaltung von T-DNA-Vektoren erfolgte in diesem Stamm.

A. tumefaciens LBA 4404 (Hoekema *et al.*, 1983): Zur Pflanzentransformation wurde dieser nicht onkogene Stamm verwendet. Er besitzt Streptomycin- und Rifampicin-Resistenzen.

2.1.5.3 Pflanzenmaterial

A. thaliana: Ökotyp Columbia (Nottingham)

Zu Beginn dieser Arbeit standen bereits *A. thaliana* Transformanten mit den Ds-T-DNAs (vergl. Abb. 3.1) der Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 163 und GUS 1xr 502 zur Verfügung (S. Blencke, unveröffentlicht).

2.2 Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die molekularbiologischen Techniken nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.2.1 Herstellung und Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* Zellen

Die Präparation und Transformation kompetenter *A. tumefaciens* Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988).

2.2.2 Anzuchtbedingungen der Pflanzen

In der Regel erfolgte die Anzucht der Pflanzen in axenischer Kultur in der Klimakammer auf Agarplatten, die verschiedene Antibiotika-Selektions-2MS/AM-Medien enthielten. Nach 2 Wochen wurden die Pflanzen in Reagenzgläser mit AM-Medium oder in Erde überführt. Das weitere Wachstum und die Abreifung der Pflanzen erfolgte in der Klimakammer (in Reagenzgläsern) oder in der Phytokammer bzw. im Gewächshaus (in Erde).

Im Gewächshaus sowie in der Klimakammer wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen gehalten, die eine Lichtperiode von 16 h und eine Dunkelperiode von 8 h bei 18°C beinhalten. Die Luftfeuchtigkeit betrug ca. 70%. Die Aufzucht in der Phytokammer erfolgte zur Förderung des Rosettenwachstums unter Kurztagsbedingungen mit 8 h Licht (20°C) und 16 h Dunkelheit (18°C).

2.2.3 Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfiltration von *A. thaliana* (in planta-Transformation)

Die Vakuuminfiltration erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bechtold *et al.* (1993). Zehn *A. thaliana* Pflanzen pro Topf wurden in Erde herangezogen und vier bis sechs Wochen unter Kurztagbedingungen gehalten. Zur Induktion der Sproßbildung wurden die Pflanzen in Langtagbedingungen überführt. Die sich entwickelnden Primärsprosse wurden zur Induktion zahlreicher Sekundärsprosse abgeschnitten.

Die zur Vakuuminfiltration verwendeten *A. tumefaciens* Stämme wurden in 500 ml YEB-Flüssigkeitsmedium mit Rifampicin, Streptomycin und Tetracyclin herangezogen und ein Aliquot wurde zur Überprüfung der Integrität der T-DNA-Vektoren entnommen. Die verbleibende Kultur wurde zentrifugiert, in einem Volumen von 200 ml IM (2.2.2) aufgenommen und auf mehrere Petrischalen verteilt. Die Infloreszenzen der Pflanzen wurden in die IM-Lösung getaucht und bei einem Vakuum von 10 bis 15 mbar für 10 Minuten in einem Exsikkator infiltriert. In einigen Experimenten erfolgte die Infiltration ohne Anlegen eines Vakuums. Die weitere Anzucht der Pflanzen erfolgte für zwei Tage in der Phytokammer und anschließend im Gewächshaus.

Die abgereiften Samen wurden oberflächensterilisiert (vergl. 2.5.6) und auf Kanamycin-haltigem Medium ausgelegt. Nur transformierte Pflanzen sind gegen dieses Antibiotikum resistent, da die T-DNA-Vektoren ein Gen tragen, welches Kanamycinresistenz vermittelt. Die weitere Anzucht der Pflanzen – diese wurden als T1-Generation bezeichnet - erfolgte unter axenischen Bedingungen in der Klimakammer. Samen dieser Pflanzen wurden für Segregationsanalysen verwendet.

2.2.4 Agrobakterien-vermittelte „Floral dip“ Infiltration von *A. thaliana* (*in planta*- Transformation)

Die „Floral dip“ Infiltration erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Clough *et. al.* (1998). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. Das Wachstum der zur Transformation verwendeten *A. tumefaciens* Stämme erfolgte in YEB-Medium mit Rifampicin, Streptomycin und Tetracyclin in einem Volumen von 700 ml. Vor der Transformation wurde ebenfalls ein Aliquot zur Überprüfung der Integrität der T-DNA-Vektoren entnommen und dann wurde die Kultur mit 200 ml dH₂O, 2 µl Silvet und 40 g Saccharose versetzt. Die Pflanzen wurden für zwei Minuten in die Kultur eingetaucht und anschließend wie unter 2.2.3 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.5 Nomenklatur der transgenen *A. thaliana* Pflanzen

a) Nomenklatur der transgenen Linien

Die transgenen Pflanzen sind entsprechend dem T-DNA Vektor benannt, welcher für die Transformation genutzt wurde. Pflanzen, die zur Vakuuminfiltration verwendet wurden, wurden als T0 Generation bezeichnet; die von diesen abstammenden fortlaufenden Generationen als T1, T2, T3 etc..

Transformanten, die aus Agrobakterien-vermittelter Wurzeltransformation (Valvekens *et al.* 1988) hervorgegangen sind, wurden mit Zahlen von eins an aufwärts bezeichnet. Das Wachstum dieser Pflanzen erfolgte in Magenta-Gefäßen.

Pflanzen, die aus *in planta*-Transformationen (Vakuuminfiltration oder „Floral dip“) hervorgingen, erhielten Nummern von 100 an aufwärts. Die Heranreifung der Nachkommen erfolgte in Reagenzgläsern oder im Gewächshaus. In Reagenzgläsern gezogene Nachkommen wurden mit zusätzlichen Ziffern von 21 aufwärts benannt. Aus dem Gewächshaus stammende Nachkommen wurden mit zusätzlichen Nummern von 11 aufwärts bezeichnet. Jede weitere Generation erhielt eine weitere Zahl entsprechend den jeweiligen Anzuchtbedingungen.

b) Nomenklatur der Kreuzungen

F1 Nachkommen von Kreuzungen homozygoter T-DNA Linien mit *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen wurden mit der Bezeichnung der T-DNA Linie und dem Zusatz „hemi“ bezeichnet.

F1 Nachkommen der Kreuzungen zwischen verschiedenen homozygoten T-DNA Linien wurden mit beiden T-DNA Linien bezeichnet und durch ein x für die Kennzeichnung einer Kreuzung getrennt. Die erstgenannte Pflanze wurde als Pollenakzeptor und die zweitgenannte als Pollendonator verwendet.

2.2.6 Sterilisation der Samenoberfläche, Wachstum und Selektion von *A. thaliana* Pflanzen

Die Oberflächensterilisation von bis zu 500 Samen erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Größere Mengen wurden in 50 ml PVC-Röhrchen sterilisiert. Die Samen wurden für 5 min mit 70 %igem Ethanol und anschließend für 5 min mit 7%iger Chlorlauge behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf das entsprechende Medium aufgebracht. Bei größeren Mengen wurden die Samen in auf 50°C erwärmte Top-Agarose aufgenommen und anschließend auf dem Medium verteilt.

Samen der infiltrierten Pflanzen und deren Nachkommen sowie die F1 Nachkommen verschiedener Kreuzungen wurden auf Kanamycin-haltigem Medium ausgelegt.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte nach zweitägiger Kältebehandlung für zwei Wochen in der Klimakammer. Entsprechend den weiteren Versuchsbedingungen wurden die Pflanzen anschließend in Reagenzgläser oder in Erde umgepflanzt und in der Klimakammer, der Phytokammer bzw. in dem Gewächshaus zur Heran- und Abreifung gebracht.

2.2.7 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Die Präparation erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Dellaporta *et al.* (1983) und dient zur Gewinnung von ca. 5 µg genomischer DNA.

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
hinzufügen

TE: 10 mM Tris/HCl pH8
1 mM EDTA pH 8

Phenol, Tris gesättigt: kristallines Phenol in 1 M Tris/HCl (pH 8) lösen, so oft mit 1 M Tris/HCl (pH 8) ausschütteln, bis die wässrige Phase einen pH 7 aufweist, Zusatz von 0,1 % (w/v) β-Hydroxychinolin, Lagerung unter Oberphase aus TE bei 4°C im Dunkeln

PCR: 2% (v/v) Isoamylalkohol
48% (v/v) Chloroform
50% (v/v) Tris gesättigtes Phenol

200-500 mg Blattmaterial wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in Stickstoff eingefroren und anschließend homogenisiert. 650 µl auf 65°C erwärmter Extraktionspuffer wurden hinzugemischt und das Material wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 240 µl 5 M Kaliumacetat wurde gevortext und zentrifugiert (4°C, 15.000 rpm, 15 min). Der Überstand wurde mit einem Volumen PCI extrahiert und die durch eine weitere Zentrifugation (RT, 12.000 rpm, 10 min) entstandene Oberphase mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 15.000 rpm, 1 min). Nach einem Waschschriff mit 70%igem EtOH wurde die DNA in 40 µl / RNase (0,1 mg/ml) resuspendiert.

2.2.8 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran („Southern Blot“) und Hybridisierung der Membran

Der Transfer von DNA auf eine Nylonmembran erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Southern (1975). Es wurde die Membran Biotodyne A der Firma PALL verwendet. Die Transfer- und Hybridisierungsbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

Die zur Hybridisierung verwendeten Sonden wurden mittels PCR (Oligonukleotide vergl. 2.1.4) oder Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA hergestellt. Nach der Auftrennung im Agarosegel wurden die entsprechenden Fragmente eluiert, aufgereinigt (High Pure PCR Purification KitTM), und ihre Konzentration bestimmt. 25 bis 100 ng der Sonden wurden zur radioaktiven Markierung nach einem Protokoll von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) verwendet.

Einer vierstündigen Inkubation der Membranen in einer Hybridisierungslösung in einer Glasröhre in einem Rolleninkubator bei 65°C folgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde der Membran unter gleichen Bedingungen über Nacht. Anschließend wurde die Membran zweimal 30 min bei 65°C mit Waschlösung inkubiert.

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

2.2.9 Isolierung von RNA aus *A. thaliana*

Die Präparation von RNA erfolgte mittels der Lösung PeqGOLD-RNA Pure™ (PeqLab Biotechnologie GmbH) anhand der Herstellerangaben. Die Methode beruht auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Die Lösung enthält Phenol und Guanidinthiocyanat. Zugabe von Chloroform führt zu einer Auftrennung in drei Phasen. In der wäßrigen ist die RNA gelöst. Zur Präparation wurden 100 mg Blattmaterial junger Rosettenblätter von 5-10 unterschiedlichen Pflanzen verwendet, die zur Gewinnung von bis zu 100 µg RNA dienten. Die Aufnahme der isolierten RNA erfolgte in 28 µl H₂O_{bidest} von denen 3 µl zur photometrischen Konzentrationsbestimmung verwendet wurden.

2.2.10 Transfer von RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membran

Die in H₂O_{bidest} gelöste RNA wurde mit 10x Elektrophoresepuffer (Endkonzentration von 20%), deionisiertem Formamid (Endkonzentration von 40% (v/v)) und Formaldehyd (Endmolarität von 2,2M) versetzt. Nach 10 minütiger Denaturierung bei 80°C erfolgte eine Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 1,5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) und Blaumarker wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. RNA Elektrophoresegele enthalten 1,2 %ige (w/v) Agarose, 1x Elektrophoresepuffer und 2,2 M Formaldehyd. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 20 V.

Lösungen:	Elektrophoresepuffer:	0,2 M Mops, pH 7 100 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 8 Das Natriumacetat wurde zuerst in H ₂ O gelöst, autoklaviert, dann mit MOPS und EDTA versetzt. Der Elektrophoresepuffer wurde nach der Sterilfiltration dunkel bei RT aufbewahrt.
	RNA-Blaumarker:	50% (v/v) Glycerol 1 mM EDTA, pH 8 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol
	Hybridisierungspuffer:	1 mM EDTA, pH 8 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 7% (w/v) N-Lauroylsarkosin-Na-Salz
	Waschlösung I:	6x SSPE 0,5% N-Lauroylsarkosin-Na-Salz

Waschlösung II:	4x SSPE 0,5% N-Lauroylsarkosin-Na-Salz
Waschlösung III:	2x SSPE 0,5% N-Lauroylsarkosin-Na-Salz

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde auf eine HybondN⁺ (Amersham) transferiert, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde. Die RNA-Membranen wurden nach erfolgreichem Transfer mindestens 30 Minuten bei 68°C in Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 58°C über Nacht. Die Membranen wurden jeweils 5 Minuten bei RT mit Waschlösung I, II und III und anschließend 15 Minuten bei 60°C mit Waschlösung III behandelt. Die Herstellung der Sonden erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben.

2.2.11 Kartierung von T-DNA flankierenden genomischen *A. thaliana* Sequenzen

Zur Amplifikation von T-DNA flankierenden Sequenzen mittels inverser PCR wurde ein verändertes Protokoll von Ochman *et al.* (1988) verwendet. Die Spaltung der genomischen DNA einer T-DNA Pflanzenlinie und die anschließende Ligation der DNA Fragmente führte zu zyklischen Ligationsprodukten. Diese können Anteile genomischer DNA und Anteile der T-DNA enthalten. In der sich anschließenden PCR Reaktion wurden Oligonukleotide verwendet, die innerhalb der T-DNA Borderbereiche binden. Dadurch konnten die angrenzenden genomischen DNA Bereiche amplifiziert werden. Die Wahl der verwendeten Oligonukleotide erfolgte so, daß die Amplifikationsprodukte lediglich geringe Bereiche der RB bzw. LB enthielt. Die Anordnung der Oligonukleotide in der RB und LB und die verwendeten Restriktionsschnittstellen ist in Abbildung 2.1 (schematisch) und 2.2 enthalten.

1 µg genomische DNA wurde mit einem geeigneten Enzym in einem Volumen von 60 µl gespalten und anschließend wurde das Enzym 10 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Bei Verwendung der Restriktionsendonuclease *Bst*YI wurden dem Restriktionsansatz neben dem 1x Restriktionspuffer BSA in einer Endkonzentration 333 µg/ml und 4 mM Spermidin hinzugefügt. Der Restriktionsansatz wurde mit Ligationspuffer und H₂O_{bidest} in ein Ligationsvolumen auf 200 µl gebracht. Die Ligation wurde mit 400 Units T4 Ligase (400.000 U/ml) über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die entstandenen Zirkel dienten als Matrize für die iPCR Reaktion.

Bei Verwendung des Restriktionsenzym *Bcl*I wurden für die Amplifikation an der LB die Oligonukleotide LBB und LB5 bzw. LB4 in der PCR eingesetzt. Die Verwendung anderer Restriktionsenzyme erforderte den Einsatz der Oligonukleotide LB1c und NPTiPCR an der LB. Die Amplifikation der RB erfolgte mit den Oligonukleotidkombinationen RB2 bzw. iPCRf1 bzw. RB00 und M13iPCR bzw. iPCRr1.

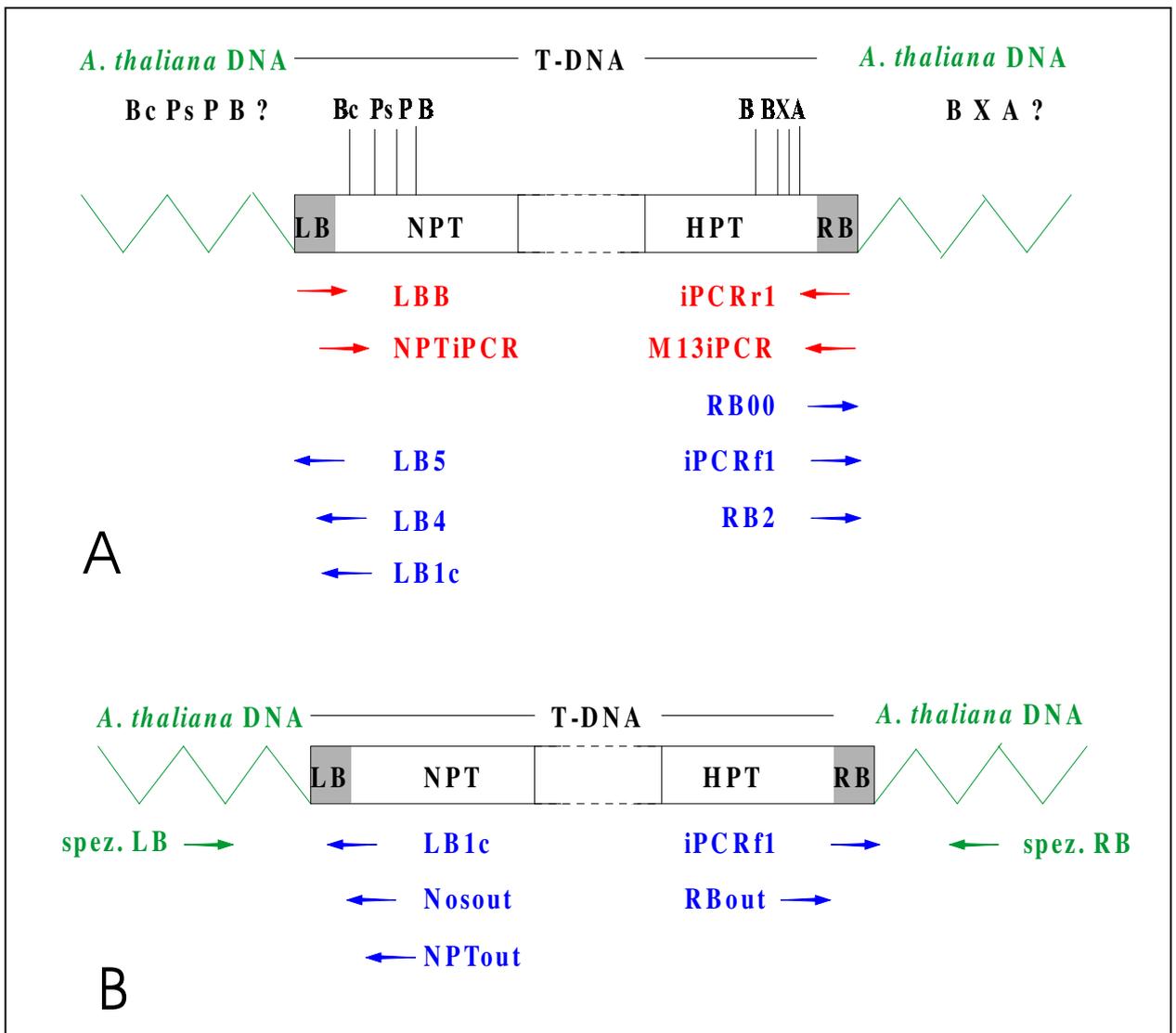


Abb. 2.1 **A** Position der in der iPCR eingesetzten Oligonukleotide, die zur Ermittlung der die T-DNA flankierenden Sequenzen verwendet wurden (nicht maßstabsgetreu)
Die Spaltung der *Arabidopsis* DNA einer T-DNA Linie erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*YI (B), *Bcl*I (Bc), *Pst*I (Ps), *Pvu*II (P), *Xho*I (X) oder *Apa*I (A). Nach erfolgter Ligation wurden zur PCR Reaktion Oligonukleotide verwendet, die an bekannte T-DANN. Sequenzen binden.
B Oligonukleotide, die verwendet wurden, um für jede T-DNA Linie spezifische PCR Produkte zu amplifizieren (nicht maßstabsgetreu)
Enthalten die iPCR Produkte homologe Sequenzen zu *A. thaliana*, wurden Oligonukleotide ermittelt, die spezifisch für die Sequenz benachbart zur LB und RB waren. Mit einem Oligonukleotid, welches an die T-DNA flankierenden Sequenzen des *Arabidopsis*-Genoms bindet (spez. LB/ spez. RB), konnten PCR-Produkte erhalten werden, die für jede T-DNA Linie spezifisch waren.

LB Sequenz des Ds-T-DNA Vektors		
1	GGCAGGATATATTCAATTGTAAATGGCTTCATGTCCGGGAAATCTA_	<u>CATGGATCAGCAAT</u> LB5
61	<u>GAGTATGATGGTC</u> AAATATGGAGAAAAAGAAAGAGTAATTACCAATTTTTTTTCAATTCAA	
121	AAATGTAGATGTCCGAGCGTTATTATAAAATGAAAGTACATTTTGATAAAA_	<u>CGACAAAT</u> LB4
181	<u>TACGATCCG</u> TCGTATTTATAGGCGAAAGCAATAAACAAATTTATTCTAATTCGGAAATCTT	
241	TA <u>TTTCGACGTGTCTACATTCACGTCCA</u> _AATGGGGCTTAGATGAGAACTTCACGATCG	LBB
301	ATGCCTT_	<u>GATTCGCCATTCCCAGATACCCA</u> TTTCATCTTCAGATTGGTCTGAGATTATG LB1c
361	CGAAAATACACACTCATATACATAAAATACTGACAGTTTGAGCTACCAATTCAGTGTAGCC	
421	CATTACCTTACATAATTCACCTCAAATGCTAGGCACTGTCTCAACTCGGCCTCAATTTGTC	
481	GGCCACTATACGATAGTTGCGCAAATTTTCAAAGTCCTGGCCTAACATCACACCTCTGTC	
	Bcl I	
541	GGCGGCGGGTCCCATTTGTGATAAAATCCACCCATCGGATGATCATGAGCGGAGAATTAAG	
601	GGAGTCACGTTATGACCCCGCGGATGACGCGGACAAGCCGTTTTAC_	<u>GTTTGGAAGTGA</u> Nosout
661	<u>CAGAAC</u> CGCAACGTTGAAGGAGCCACTGAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAAATGAGCTAAG	
721	CACATACGTCAGAAAACCATTTATTGCGCGTTCAAAAAGTCGCCCTAAGGTCACCTATCAGCTAG	
781	CAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAAATCCCCTCGGTATCCAAT	
841	TAGAGTCTCATATTCACCTCTCTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAAA	
901	CAACATTACAATTACATTTACAATTACCATGGTTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTTC	
961	TCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAAC_	<u>AGACAATCGGCTG</u> NPtOut
1021	<u>CTCTGATG</u> CCGCCGTGTTCCGGCTGTGACGCGAGGGCGCCC <u>GGTTCTTTTTGTCAAGAC</u> NPtiPCR	
	Pst I	
1081	<u>CGACCTGTCC</u> _GGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGC	
	Pvu II	
1141	CACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTG	
	BstYI	
1201	GCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGA	
RB Sequenz des Ds-T-DNA Vektors		
7900	GCTTGGTT <u>GACGGCAATTTTCGATGATGCA</u> _GCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCG	RBout
7960	TCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCT	
8020	GGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCCGACGCCCCAGCACTCGTC	
	BstYI	
8080	CGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGGATCCGAAGCAGATCGTTCAAACATTT	
8140	GGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAAT	
8200	TTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGA	
8260	GATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAA	
	BstYI	
8320	TATAGCGCGCAAACTAGGATAAAATTATCGCGCGGGTGTCTATCTATGTTACTAGATCGCA	
	Xba I Apa I	
8380	GATCCTCTAGAGTCGAAGGGGGGGCCCGGTACGTACCAGCTTTTGTTCCTTTTAGTGAGG	
8440	GTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAAT_	<u>CATGGTCATAGCTGTTTCTG</u> TGTGAAATTGTTATCC M13iPCR
8500	G_	<u>CTCACAATTCACACAACATACGAGC</u> CGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA iPCRr1
8560	ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA	
8620	CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTAT	
8680	TGGAACATCTACAAATGCTTTTCTTATCGACCATGTACGTAAGCGTTACGTTTTTTGG	
8740	TG <u>GACCCCTTGAGGAACTGGTAGCTGTTG</u> _TGGGCCTGTGGTCTCAAGATGGATCATTAAT	RB00
8800	TTCCACCTTACCTACGATGGGGGCGATCGCAC <u>CGGTGAGTAATATTGTACGGCTAAGA_G</u>	iPCRf1
8860	<u>CGAATTTGGCCTGTAGACCTCA</u> _ATTGCGAGCTTTCTAATTTCAAACCTATTCCGGCCCTAAC	RB2
8920	TTTTGGTGTGATGATGCTGACTGGCAGGATATATACCGTTGTAATT	

Abb. 2.2 Lage der Restriktionsschnittstellen und der zur iPCR von T-DNA flankierenden Sequenzen im *Arabidopsis*-Genom genutzten Oligonukleotide in den Borderbereichen des T-DNA Vektors
 Die Sequenz ist 5' – 3' dargestellt. Die Oligonukleotide, die relativ zur T-DNA in Richtung der genomischen *A. thaliana* Sequenz angeordnet sind, sind blau dargestellt (vergl. schematische Darstellung in Abb. 2.1). Die roten Oligonukleotide sind relativ zur T-DNA in Richtung der Gene HPT und NPT angeordnet. Die bp Bezeichnung wurde anhand des Ds-T-DNA Vektors dargestellt (vergl. schematische Darstellung in Abb. 3.1).

2.2.13 Datenbankanalysen

Sollten homologe Sequenzen für mittels iPCR oder PCR ermittelte Sequenzen durchgeführt werden, so erfolgte die Analyse mit Hilfe des BLAST-Programms (Atschul *et al.* 1990) in den TAIR (The Arabidopsis Information Ressource) und NCBI (National Centers for Biotechnology Information) Datenbanken. Zur Durchsuchung aller *Arabidopsis*-Sequenzen in der TAIR-Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/blast/>) wurde die Option „GenBank“ gewählt, die alle Sequenzen von Arabidopsis mit ESTs und BAC Endsequenzen umfaßt. In der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) konnten mit der Option „nr“ alle vorhandenen Sequenzen auf Homologie hin untersucht werden.

Eine vergleichende Sequenzanalyse der T-DNA Borderbereiche der transgenen Linien wurde mittels eines Vergleichsprogramms (<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>) vorgenommen.

2.2.14 β -Glucuronidase-Aktivitätstests

a) Semiquantitativer β -Glucuronidase-Aktivitätstest

Die semi-quantitative Analysetechnik dient zur schnellen und optischen Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität transformierter Pflanzen und beruht auf der indirekten Ermittlung der Genaktivität über die Umsetzung des Substrates X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Glucuronsäure). Von 5 bis 10 unterschiedlichen Pflanzen wurden jeweils 2 Blattstücke der jungen Rosettenblätter entnommen und in 100 μ l X-Gluc-Puffer inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 96er Mikrotiterplatten über Nacht bei 37°C.

Lösungen:	X-Gluc-Puffer:	50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 1 mM EDTA, pH 8 0,1% (v/v) Triton-X-100 1 mM X-Gluc
-----------	----------------	--

b) Quantitativer β -Glucuronidase-Aktivitätstest

Der quantitative β -Glucuronidase-Aktivitätstest erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987). Dieser Test ermittelt die β -Glucuronidase-Genaktivität indirekt über die Fähigkeit des GUS-Proteins, das Substrat 4-MUG (4 Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid-Trihydrat) zu 4-MU (4-Methylumbelliferon) umzusetzen. Das Reaktionsprodukt 4-MU fluoresziert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 360 nm und emittiert bei 455 nm. Durch Messung der Fluoreszenz bei 455 nm über einen bestimmten Zeitraum hinweg kann der Umsatz von 4-MUG zu 4-MU

2.2.15 Bestimmung der relativen GFP Fluoreszenz

Die quantitative Bestimmung der relativen GFP Fluoreszenz erfolgte für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Dessen Anzucht erfolgte wie unter 2.2.14 beschrieben. 50 mg Blattmaterial wurde von möglichst jungen Rosettenblättern unterschiedlicher Pflanzen in ein Reaktionsgefäß geerntet, homogenisiert und mit 500 ml Tris, pH 8 versetzt.

Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte durch das Fluorometer der Firma Bio-Rad. Der Nullwert wurde durch Tris pH 8 festgesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

Ein Aliquot des Blattextraktes wurde zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in 20%iger Lösung des Bradford-Reagenz der Firma Bio-Rad eingesetzt. Die Messung wurde bei OD₅₉₅ im Photometer Perkin Elmer Lambda 20 durchgeführt. Eine Eichgerade wurde mit BSA-Konzentrationen von 1 bis 20 µg/ml ermittelt.

Die GFP-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{GFP-Aktivität [relative Einheiten/mg Protein]} = \frac{10^3 \times m_1 \times F \times E_{490}}{D \times A \times (\text{OD}_{595} - b_1)}$$

mit:	A:	eingesetzter Extrakt [µl]
	D:	im Fluorometer gemessenes Volumen [ml]
	F:	eingesetztes Volumen in der Proteinbestimmung [µl]
	E ₄₈₀ :	gemessene Fluoreszenz der Probe
	OD ₅₉₅ :	gemessene Extinktion bei der Proteinmessung
	m ₁ :	Steigung der Proteineichgerade [ml/µg]
	b ₁ :	Schnittpunkt der Proteineichgerade mit der y-Achse

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob die unmittelbare Nachbarschaft repetitiver DNA-Elemente die Transgenexpression in *A. thaliana* beeinflusst. Außerdem sollte getestet werden, ob zusätzlich vorliegende homologe DNA Bereiche einen Einfluß auf die Reporterogenaktivität haben.

Zur systematischen Untersuchung der Gen-Inaktivierung des Transgens β -Glucuronidase durch ein weiteres Transgen in *antisense* Genorientierung wurden transgene *A. thaliana* Pflanzen untersucht, die T-DNAs einer *antisense* Reportergenkassette und ein bis mehrere GUS-Gene in *sense* Orientierung besitzen.

Die Etablierung und Analyse der Pflanzenlinien, die für die vergleichenden Expressionsanalysen verwendet wurden, ist in 3.1 beschrieben. In 3.2 sind Studien zur Kartierung und detaillierten Analyse der T-DNA Integrationen im Pflanzengenom aufgeführt. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen der Reporter Gene sind unter 3.3 zusammengefaßt.

3.1 Analyse und Etablierung der verwendeten Pflanzenlinien

3.1.1 Verwendete und erstellte T-DNA-Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte (vergl. Abb. 3.1) sind Derivate des binären Vektors SLJ7292 (Jones *et al.* 1992). Diese Plasmide besitzen *E. coli* und *A. tumefaciens* Replikationsursprünge, die die Amplifizierung der Konstrukte in *E. coli* und *A. tumefaciens* ermöglichen. Ein Gen, welches Tetracyclin-Resistenz vermittelt, erlaubt die selektive Erfassung von Transformanten in Bakterien.

Agrobakterien vermittelte Transformationsereignisse in Pflanzen wurden mittels eines chimären Neomycinphosphotransferasegens (NPT) identifiziert. Die Pflanze erhält durch das NPT-Gen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin (Matsumura *et al.*, 1984). Das Neomycinphosphotransferasegen befindet sich unter der Kontrolle des Nopalinsynthase-Promotors (pnos, Depicker *et al.*, 1982) und wird durch das 3'-Ende des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens* (Gielen *et al.*, 1984) terminiert.

Die verwendeten T-DNAs (Odell *et al.*, 1984) enthalten ein chimäres β -Glucuronidasegen (GUS, Jefferson *et al.*, 1987) oder ein chimäres GFP-Gen (mgpf4-ER, *modified green fluorescent protein* mit ER-Signalpeptid; Chalfie *et al.*, 1994) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Als Polyadenylierungssignal wird das 3'-Ende des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens* (Gielen *et al.*, 1984) verwendet. Die Expression dieser Gene kann in Pflanzen mit Hilfe qualitativer und quantitativer Nachweismethoden sehr gut erfaßt werden.

Die Erstellung von Vektoren (GUS 1xr repeat) mit repetitiven *A. thaliana* Elementen in der Nähe des CaMV 35S Promotors sollte es ermöglichen in transgenen Pflanzen den Einfluß solcher auf die Reporter-Expression zu analysieren. Die verwendeten repetitiven Elemente der 180 bp und 500 bp Familien (Simoens *et al.*, 1988), der intergenische *SalI Spacer* der rRNA Gene (Gruendler *et al.*, 1991) und die repetitiven Elemente 163 und 164 (Thompson *et al.*, 1996) wurden in direkter Nachbarschaft zum CaMV 35S Promotor des Reportergens GUS kloniert (vergl. Abb. 3.1, S. Bahadur, M. Gils, unveröffentlicht). Sie weisen in den Konstrukten eine Länge von 380 (pAL), 500 (501), 1000 (502), 4000 (rDNA), 450 (163) und 900 (164) bp auf.

Um Untersuchungen zu ermöglichen, die zeigen ob DNA-DNA Wechselwirkungen die Transgenexpression beeinflussen, wurde ein Konstrukt erstellt und in Pflanzen eingebracht, das sowohl ein promotorloses wie auch ein β -Glucuronidase Reporter-Gen unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors enthält (Δ GUS 2a). Ein weiterer T-DNA Vektor enthielt lediglich ein promotorloses GUS Reporter-Gen (Δ GUS). (Abb. 3.1)

Die Klonierung eines promotorlosen GUS Reporter-Genes (Δ GUS) erfolgte durch eine *XhoI* Restriktion des Vektors SLJDsHPT-GUS (Q5) (S. Bahadur, unveröffentlicht) und anschließende Religation. Diese entfernte den 35S CaMV Promotor der GUS-Reporter-Genkassette (=SLJDsHPT-GUS (Q5) Δ *XhoI*). Zur Erstellung des Konstruktes Δ GUS 2a wurde die 35S-GUS-Reporter-Genkassette mit dem Restriktionsenzym *HindIII* aus dem Vektor SLJGUS (S. Bahadur, unveröffentlicht) herausgetrennt und in den ebenfalls mit *HindIII* geschnittenen Vektor SLJDsHPT-GUS (Q5) Δ *XhoI* kloniert.

Es sollten Effekte von *antisense* Transkripten auf die GUS-Transgen-Expression analysiert werden. Dazu wurde das β -Glucuronidase-Gen in einer Kopie in *antisense* Orientierung kloniert (GUS AS r) und in Pflanzen eingebracht. Ein weiterer T-DNA Vektor enthält sowohl ein GUS-Gen in *antisense* als auch in *sense* Genorientierung (GUS S/AS f). Dieser Vektor wurde ebenfalls in Pflanzen eingebracht.

Eine erste Klonierung erfolgte mit Hilfe des Hochkopienzahlplasmides SLJGUS (S. Bahadur, unveröffentlicht) durch eine *XhoI/XbaI* Restriktion, das Auffüllen der 5' überhängenden Enden zum Doppelstrang und anschließende Ligation. Die Transformanten wurden auf ampicillinhaltigem Medium selektiert und hinsichtlich Genorientierung überprüft. Transformanten, die das GUS-Gen in *antisense* Orientierung trugen, wurden ausgewählt (=SLJGUS AS). Zur Erstellung des T-DNA Vektors GUS AS r wurde die *antisense* GUS-Reporter-Genkassette des Vektors SLJGUS AS mittels *HindIII* Spaltung herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *HindIII* geschnittenen Vektor SLJDsHPT (S. Bahadur, unveröffentlicht) kloniert.

Zur Erstellung des Konstruktes GUS S/AS f wurde der Vektor SLJ GUS AS mit *HindIII* gespalten und die GUSAS Reporter-Genkassette wurde in den ebenfalls mit *HindIII* geschnittenen Vektor pSP73HK-GUSL1(1) (S. Bahadur, unveröffentlicht) kloniert. Es resultierte der Vektor pSP73HK-GUSL1(1) GUS AS, welcher zusätzlich zur antisense Reporter-Genkassette die GUS-Reporter-Genkassette ohne Promotor enthält. Dieses Insert wurde mit *XhoI* herausgeschnitten und

in einen Ds-T-DNA Vektor SLJDsHPT- Δ XhoI(SPT8,GUSL1), welcher einen 35S CaMV Promotor enthält, kloniert.

Alle Reporterengenkassetten liegen in dem nicht autonomen Derivat (*Ds*) des transponierbaren Elements *Ac* vor (*sAc*, Bancroft *et al.*, 1992). (Abb. 3.1)

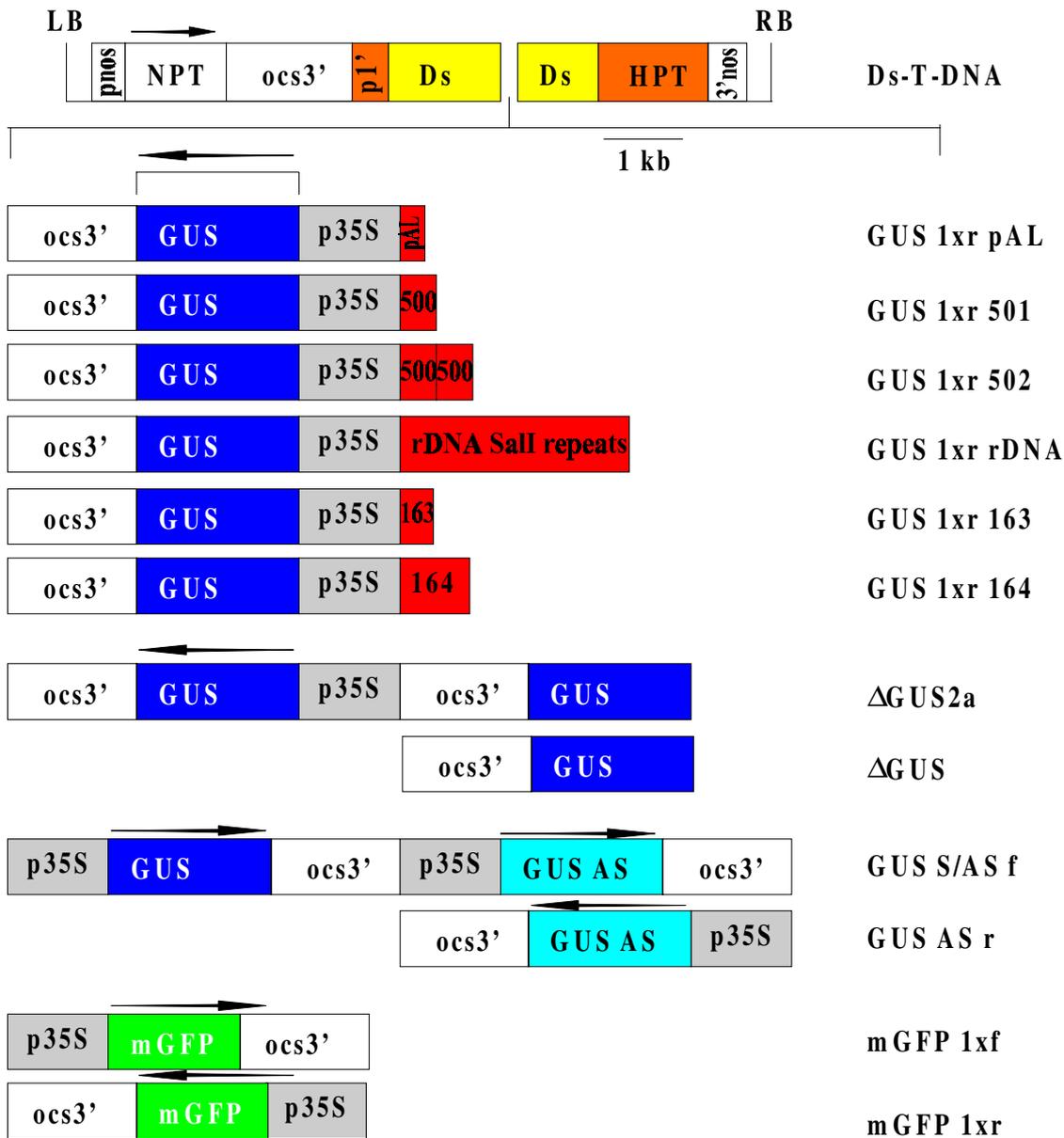


Abb. 3.1 **Verwendete T-DNA Vektoren**

Abkürzungen: p35S (CaMV 35S-Promotor; Odell *et al.*, 1984), p1' (P1'-Promotor; Harpster *et al.*, 1988), ocs3' (3' Ende des Octopinsynthesegens; Gielen *et al.*, 1984), pnos (Promotor des Nopalinsynthesegens; Depicker *et al.*, 1982), NPT (Neomycinphosphotransferase; Matsumura *et al.*, 1984), HPT, Hygromycinphosphotransferase (Malpartida *et al.*, 1983); GUS (β -Glucuronidasegen; Jefferson *et al.*, 1987), mGFP (*modified green fluorescent protein* Gen; Haseloff *et al.*, 1997), LB (linke Grenze der T-DNA), RB (rechte Grenze der T-DNA, Gielen *et al.*, 1984), GUS AS (β -Glucuronidase-Gen in antisense Orientierung). Die Transkriptionsrichtungen der Gene NPT, GUS, GUS AS, und mGFP sind durch Pfeile angedeutet.

3.1.2 Stabilität der T-DNA Konstrukte in *A. tumefaciens*

Zur Überprüfung der T-DNA Konstruktintegrität wurde vor der Infiltration ein Aliquot des *A. tumefaciens* Kulturvolumens entnommen und mehreren Restriktions- und Southern Blot Analysen unterzogen. Die verwendeten Konstrukte mit einer Reporterengenkassette des GUS und des GFP Gens wiesen in den analysierten Konstrukten keine Hinweise auf Instabilität der T-DNA auf. Für das Konstrukt Δ GUS 2a wurde in einigen Fällen der Verlust einer Reporterengenkassette nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Transformationen von *A. thaliana*

Die Erzeugung von transgenen *A. thaliana* Pflanzen erfolgte durch *Agrobakterien*-vermittelte Wurzeltransformationen (Valvekens *et al.*, 1988) (S. Blencke, M. Gils, unveröffentlicht) und durch *in planta* Transformationsmethoden (Bechtold *et al.*, 1993, Clough *et al.*, 1998, S. Stegemann, unveröffentlicht). Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte auf Kanamycin-haltigem Medium. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Transformanten sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

T-DNA Konstrukt	Wurzeltransformation	in-planta Transformation		
	regenerierte Pflanzen (Kanamycin resistent) mit Samenansatz	Samen	Transformanten	Effizienz (%)
pAL	10	189.000	117	0,062
163	2	458.500	546	0,119
164	8	691.500	1.154	0,167
501	10	556.500	108	0,019
502	3	526.500	188	0,036
rDNA	3	807.000	122	0,015
mgfp 1xf	8	452.000	134	0,030
mgfp 1xr	5	445.500	131	0,029
Δ GUS	#	318.500	207	0,065
Δ GUS2a	#	331.000	163	0,049
GUS AS 1xr	#	327.500	149	0,045
GUS S/AS f*	#	529.500	290	0,055
Σ	53	5.633.000	3.309	0,059

Tabelle 3.1 Ergebnisse der Wurzeltransformation und der *in planta* Transformation

Mit einem # markierte T-DNA-Konstrukte wurden nicht zur Wurzeltransformation verwendet. Die Vakuuminfiltration war die vorrangige *in planta* Transformationsmethode (Bechtold *et al.*, 1993).

Mit einem * markierte T-DNA-Konstrukte wurden zusätzlich in der „Floral Dip“ Transformationsmethode verwendet (Clough *et al.*, 1998).

Die gewonnenen Samen der infiltrierten Pflanzen wurden gewogen. 1 g entsprechen ca. 50.000 Samen.

3.1.4 Analyse der *A. thaliana* Transformanten

Im Verlauf der *A. tumefaciens* vermittelten Transformation kommt es häufig zu einer Integration von mehreren T-DNAs im Pflanzengenom. Diese können an einem oder an verschiedenen Loci vorliegen und in Form von singulären, unvollständigen oder komplexen Strukturen angeordnet sein (Jorgensen *et al.*, 1987; Koncz *et al.*, 1994; De Neve *et al.*, 1997).

Um einen Effekt des Integrationsmusters der T-DNAs auf die Transgenexpression auszuschließen, ist eine genetische und molekulare Analyse der Transformanten nötig. Ziel war es, Pflanzenlinien zu etablieren, die lediglich eine vollständige T-DNA Kopie im Genom enthalten. Diese sollten für gezielte Transgen-Expressionsanalysen sowie für Integrationsstudien der T-DNA genutzt werden.

Die genetische Analyse wurde anhand von Segregationsversuchen in der Nachkommenschaft (T1-Generation) der Transformanten (T0-Generation) durchgeführt. Das chimäre Neomycinphosphotransferasegen ist ein dominanter Marker und vermittelt Kanamycin-Resistenz, so daß das Verhältnis von resistenten und sensitiven Pflanzen auf Kanamycin-haltigem Medium ermittelt werden konnte. Die Resultate geben Aufschluß über die Anzahl der segregierenden Loci. Die T0-Pflanzen sind hemizygot (Mengiste *et al.*, 1997). Folglich ist in den Nachkommen einer Transformante, die einen T-DNA Locus trägt, entsprechend den Mendelschen Regeln, eine Segregation von drei Kanamycin-resistenten zu einer Kanamycin-sensitiven Pflanze zu finden. Die Segregation wurde mittels des Chi-Quadrat Tests statistisch ausgewertet. Ausschließlich Pflanzen mit einer solchen Segregation wurden der nachfolgenden molekulargenetischen Analyse unterzogen.

3.1.4.1 Genetische Analyse transformierter *A. thaliana* Pflanzen

Zur genetischen Segregationsanalyse transformierter Pflanzen wurden die durch Selbstung erhaltenen Samen der T1-Generation auf Kanamycin-haltigem Medium ausgelegt und das Verhältnis von resistenten und sensitiven Pflanzen bestimmt. Bei einer ermittelten Verteilung von 3:1 besitzen die Pflanzen mit großer Wahrscheinlichkeit einen T-DNA Locus. Die Analyse kann jedoch eine genetisch enge Kopplung zweier oder mehrer Loci nicht ausschließen.

Tabelle 3.2 faßt die Ergebnisse der Segregationsanalyse der transgenen *A. thaliana* Pflanzen zusammen. Anhand der Segregationsanalyse weisen 76% der Pflanzenlinien einen Locus und 16% mehrere Loci der T-DNA Integration auf. Für 8% der Transformanten konnte eine <3:1 Segregation ermittelt werden. Ursachen für eine solche Segregation können epigenetische Effekte oder embryonale Mutationen sein.

T-DNA Konstrukt	untersuchte Transformanten (KanR)	Segregation >3:1	Segregation 3:1	Segregation <3:1
pAL	43	7	31	5
163	35	5	26	2
164	60	22	38	6
501	49	10	47	2
502	57	6	46	5
rDNA	29	4	21	4
mgfp 1xf	35	4	30	1
mgfp 1xr	49	7	43	4
ΔGUS	23	4	18	1
ΔGUS 2a	43	14	25	4
GUS AS 1xr	23	-	23	-
GUS S/AS f	40	6	32	2
Σ	424	69	323	30

Tabelle 3.2 Ergebnisse der Segregationsanalyse transformierter *A. thaliana* Pflanzen

Die Einteilung der Pflanzenlinien in die verschiedenen Segregationsgruppen erfolgte durch eine Chi-Quadrat-Analyse. Die angelegte Signifikanz betrug $P=0,05$.

3.1.4.2 Molekulare Analyse transformierter *A. thaliana* Pflanzen mit einem T-DNA Locus

Durch die Segregationsanalyse wurden transgene Linien identifiziert, die T-DNA Sequenzen nur an einem Locus tragen. Diese Analyse erfaßt jedoch nicht, ob nur eine Kopie der T-DNA an diesem Locus vorliegt und ob diese vollständig ist. Um dieses zu klären, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt.

Durch die Verwendung von Restriktionsenzymen mit Erkennungssequenzen nahe der T-DNA Enden konnten Restriktionsfragmente erzeugt werden, die zu einem Teil aus genomischer *A.thaliana* DNA und zum anderen aus T-DNA-Sequenzen bestehen. Die Restriktionsschnittstelle innerhalb der genomischen *A. thaliana* DNA liegt in zufälliger Entfernung zur T-DNA und ergibt daher für jede unabhängige T-DNA Integration ein Restriktionsfragment spezifischer Größe. Durch Southern Blot Analyse der transgenen Linien und anschließende Hybridisierungen mit geeigneten T-DNA spezifischen Sonden (komplementär zum NPT-Gen, HPT-Gen) konnte die Anzahl der T-DNA Integrationen im Pflanzengenom überprüft werden. Die Pflanzenlinien, die aufgrund dieser Analyse eine vollständige T-DNA aufwiesen, wurden zusätzlich mit Sonden der LB- und RB-Sequenzen überprüft, um Partialintegrationen der Bordersequenzen zu ermitteln. Sehr kleine T-DNA Fragmente können jedoch durch eine Southern Blot Analyse nicht nachgewiesen werden.

Sonden, die T-DNA Restriktionsfragmente bekannter Größe detektieren, dienen zur Überprüfung der Vollständigkeit bzw. der Integrität der in der T-DNA enthaltenen Reportergenkassetten. Außerdem wurde so für die Konstrukte GUS 1xr *repeat* die Präsenz der repetitiven Elementen festgestellt.

Anhand einiger Pflanzenlinien, deren T-DNA den Konstrukten GUS 1xr 163, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr pAL oder GUS 1xr 501 entspricht, soll die Analysestrategie zur Etablierung von Pflanzenlinien mit einer vollständigen T-DNA exemplarisch dargestellt werden (s. Abb. 3.2). Genomische DNA von 12 Transformanten mit einem T-DNA Locus wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/ApaI*, *EcoRI/BglII* sowie *XhoI* gespalten.

Die Spaltungen mit *EcoRI/BglII* und *EcoRI/ApaI* ergeben unter anderem Fragmente, die aus genomischer *A. thaliana*- sowie T-DNA-Sequenzen bestehen. Hybridisierungen mit den radioaktiv markierten Sonden NPT und HPT ermöglichen die Bestimmung der Anzahl von Fragmenten im transgenen Pflanzengenom, die den linken bzw. rechten Grenzen der T-DNA entsprechen. Die Sonde HPT detektiert in der Hybridisierung bei Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI/ApaI* nur interne Fragmente. Diese weisen eine Größe von 1,0 kb und spezifische Fragmente für die Konstrukte GUS 1xr 163, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr pAL und GUS 1xr 501 von 5,5 kb, 4,0 kb, 5,3 kb und 5,5 kb auf. Die Restriktion der genomischen DNA mit der Enzymkombination *EcoRI/BglII* ergibt in der Hybridisierung mit der Sonde HPT ein internes T-DNA Fragment der rechten Border und Fragmente, die sowohl aus T-DNA Sequenzen der rechten Border und genomischer *A. thaliana* DNA bestehen. Die Fragmente, die ausschließlich T-DNA enthalten, weisen in der Hybridisierung mit HPT je nach T-DNA Konstrukt spezifische Größen von 2,7 kb (GUS 1xr 163), 2,8 kb (GUS 1xr rDNA), 2,6 kb (GUS 1xr pAL) und 1,4 kb (GUS 1xr 501) auf. In der Hybridisierung mit der Sonde NPT werden in den Restriktionskombinationen *EcoRI/ApaI* und *EcoRI/BglII* ausschließlich Fragmente detektiert, die sowohl genomische *A. thaliana* DNA als auch T-DNA Bordersequenzen enthalten. Die Zahl der ermittelten Hybridisierungssignale entsprechen daher der Anzahl der im transgenen Pflanzengenom enthaltenen Fragmente der linken Border. Transformanten, die T-DNAs in invertierter Orientierung tragen, können nicht immer mit der Southern Blot Analyse nachgewiesen werden, wenn sich die Größen der beiden flankierenden genomischen Bereiche für die verwendeten Restriktionsenzyme entsprechen.

Die Hybridisierung mit der Sonde GUS ermöglicht eine Überprüfung der im transgenen Pflanzengenom befindlichen Reportergerätekassette; kleinere Sequenzveränderungen können jedoch nicht detektiert werden. Die Restriktion der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *XhoI* und anschließende Southern Blot Hybridisierung mit einer zum 35S CaMV Promotor korrespondierenden Sonde ermöglicht den Nachweis der repetitiven Elemente in der T-DNA der transformierten *A. thaliana* Pflanzen. Dies wurde auch durch die Hybridisierung mit der Sonde HPT analysiert. Die repetitiven Elemente wurden zusätzlich anhand von PCR-Experimenten nachgewiesen. Die Amplifikation erfolgte mit p35S und Ds spezifischen Oligonukleotiden. Die erhaltenen PCR Fragmente wurden nach erfolgtem Southern Blot Transfer mit Sonden der entsprechenden repetitiven Elemente pAL, 500, rDNA, 163 und 164 hybridisiert (Daten nicht gezeigt).

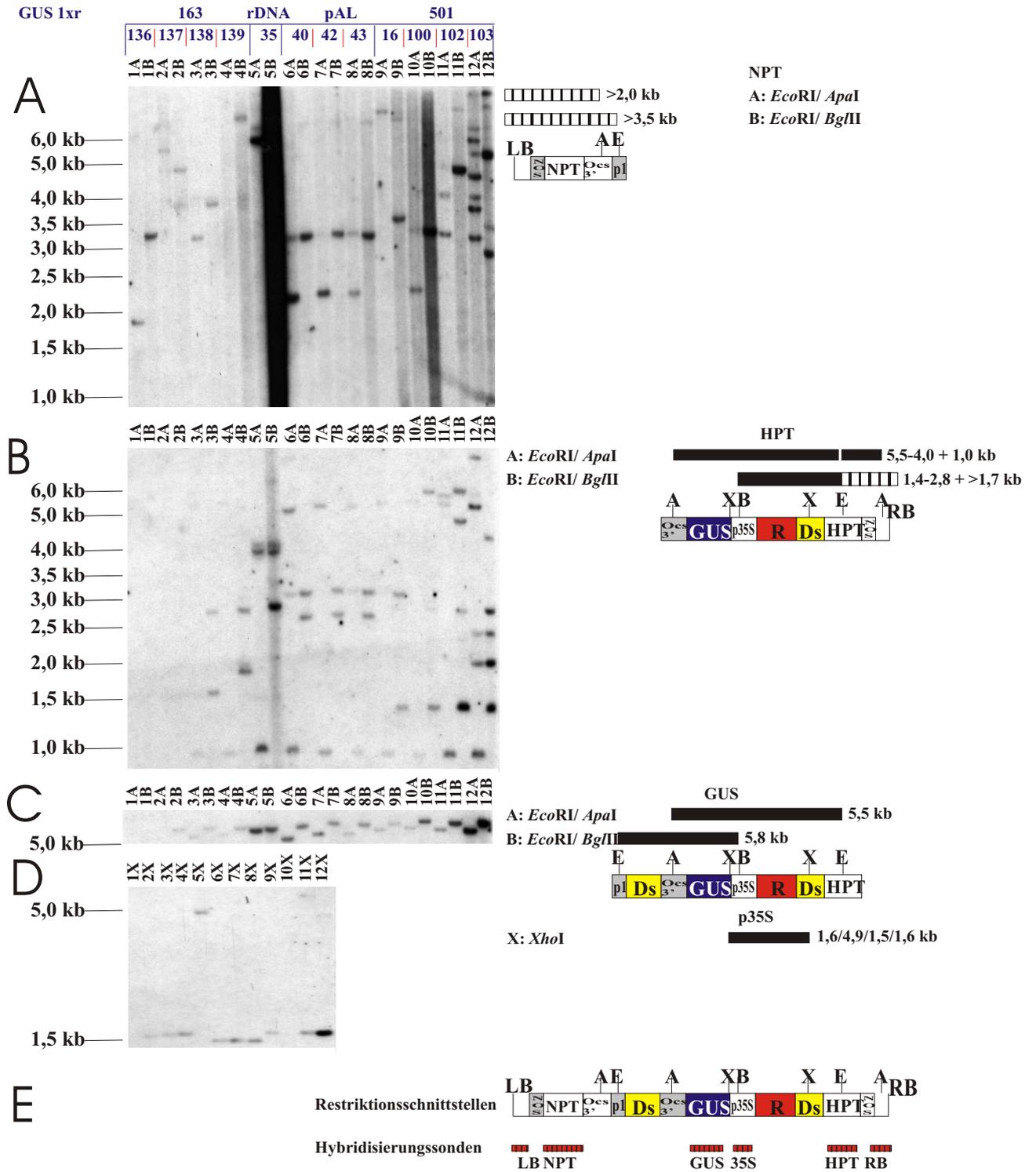


Abb. 3.2 Southern Blot Analyse zur Identifizierung von *A. thaliana* Linien mit intakten GUS 1xr 163, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr pAL und GUS 1xr 502 T-DNAs in Einzelkopie
 Genomische *A. thaliana* DNA wurde mit *EcoRI* und *BglII* bzw. *EcoRI* und *ApaI* (A, B und C) sowie *XhoI* (D) geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach Hybridisierung der Membranen mit den radioaktiv markierten Fragmenten NPT (A), HPT (B), GUS(C) und p35S(D) E: Restriktionskarte des T-DNA Konstruktes GUS 1xr repeat mit resultierenden Fragmentgrößen (A: *ApaI*, B: *BglII*, E: *EcoRI*, X: *XhoI*). Neben den Autoradiogrammen sind für die entsprechenden Sonden die detektierbaren Fragmente dargestellt. Die schwarz markierten Fragmente detektieren ausschließlich T-DNA, während die schraffierten Fragmente sowohl *A. thaliana*- als auch T-DNA Sequenzen enthalten.

Die Hybridisierungsmuster in den Gelspuren 3 (A+B), 4 (A+B) und 7 (A+B) (Linien GUS 1xr 163 138, GUS 1xr 163 139 und GUS 1xr pAL 42) entspricht den Erwartungen für die Integration einer einzelnen T-DNA mit einer vollständigen GUS-Reportergenkassette und den entsprechenden repetitiven Elementen (s. Abb. 3.2 A,B,C,D). Die Pflanzenlinien GUS 1xr rDNA 35, GUS 1xr 501 16, GUS 1xr 501 100, GUS 1xr 501 102 und GUS 1xr 501 103 besitzen mehrere Fragmente der linken Border (s. Abb. 3.2; A).

Das Ergebnis der Hybridisierung mit HPT (vergl. Abb. 3.2; B) als Sonde verdeutlicht für die Pflanzenlinie GUS 1xr rDNA 35 (Spur 5) zwei, die Linie GUS 1xr 501 102 (Spur 11) zwei und die Pflanzenlinie GUS 1xr 501 103 (Spur 12) vier Fragmente, die neben den T-DNA-spezifischen Fragmenten detektiert werden. Somit liegen zwei bzw. vier RB-Bereiche vor. In der Pflanzenlinien GUS 1xr 163 136 und GUS 1xr 163 137 (Spuren 1 und 2) scheint es zum Verlust der RB-Region gekommen zu sein. Diese Deletion erstreckt sich für die Linie GUS 1xr 163 136 auch auf den Bereich des repetitiven Elements 163 und des GUS-Gens der T-DNA (Abb. 3.2C, 3.2D, Spuren 1). Die genomische DNA der Pflanzenlinien GUS 1xr pAL 40 (Spur 6), GUS 1xr pAL 42 (Spur 7) und GUS 1xr pAL 43 (Spur 8) zeigt in den Hybridisierungen mit den Sonden NPT und HPT identische Fragmentgrößen. Die Linien GUS 1xr pAL 40 und GUS 1xr pAL 43 weisen jedoch in beiden Hybridisierungen der *EcoRI/ApaI* geschnittenen genomischen DNA ein zusätzliches Fragment auf, das aufgrund der Hybridisierungsstärke auf eine Partialrestriktion hindeuten könnte. Die Linien GUS 1xr 40, GUS 1xr 42 und GUS 1xr 43 sind vermutlich auf ein klonales Ereignis der Wurzeltransformation zurückzuführen und stellen daher eine identische T-DNA Linie dar.

Tabelle 3.3 faßt die Ergebnisse der Southern Blot Analysen für die T-DNA Linien, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, zusammen. Eine detaillierte Auflistung der Southern Blot Analysen ist in Tabelle 6.1 (Anhang) enthalten.

T-DNA	getestete Linien	Integration der T-DNA mit vollständiger Reporter-genkassette	mehrere T-DNA Integrationen	zusätzliche unvollständige Reporter-genkassetten	keine Hybridisierung mit der Sonde HPT	keine Hybridisierung mit der Sonde GUS bzw. GFP	keine Hybridisierung mit der Sonde p35S
GUS 1xr pAL	29	6 (21%)	15 (52%)	3 (10%)	2 (7%)	3 (10%)	9 (31%)
GUS 1xr 501	31	3 (10%)	25 (81%)	9 (29%)	6 (19%)	2 (6%)	1 (3%)
GUS 1xr 502	32	7 (22%)	22 (69%)	4 (13%)	5 (16%)	4 (13%)	5 (16%)
GUS 1xr rDNA	24	5 (21%)	11 (46%)	6 (25%)	8 (33%)	8 (33%)	4 (17%)
GUS 1xr 163	25	5 (20%)	15 (60%)	1 (4%)	5 (20%)	3 (12%)	4 (16%)
GUS 1xr 164	31	3 (10%)	24 (77%)	2 (6%)	5 (16%)	2 (6%)	4 (13%)
ΔGUS	15	5 (33%)	8 (53%)	1 (7%)	3 (20%)	1 (7%)	-
ΔGUS 2a	17	2 (12%)	9 (53%)	4 (24%)	3 (18%)	1 (6%)	-
GUS AS r	13	4 (31%)	8 (62%)	-	1 (8%)	-	-
GUS S/AS f	28	9 (32%)	13 (46%)	1 (4%)	3 (11%)	-	-
mGFP 1xf	22	4 (18%)	15 (68%)	3 (14%)	4 (18%)	4 (18%)	-
mGFP 1xr	19	4 (21%)	13 (68%)	-	2 (11%)	2 (11%)	-

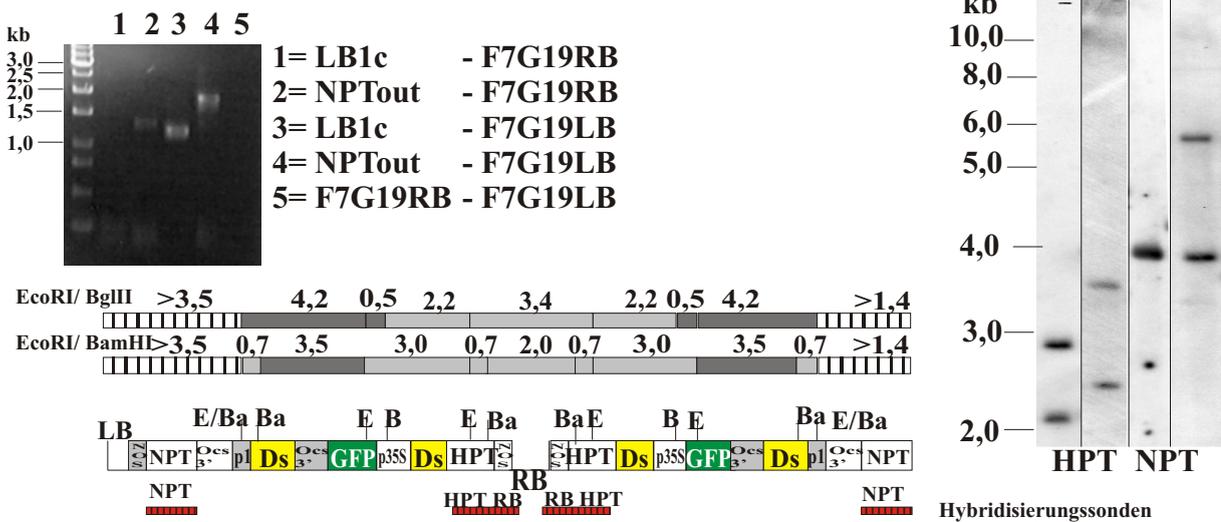
Tabelle 3.3 Ergebnisse der Southern Blot Analysen

Es ist zu beachten, daß sich bestimmte Kategorien nicht ausschließen. Daher überschreitet die Zahl der in Klassen eingeteilten Pflanzen in einigen Fällen die der Gesamtzahl untersuchter Pflanzen.

3.1.4.3 Molekulare Analyse transformierter *A. thaliana* Pflanzen mit zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus

Innerhalb der durchgeführten Restriktions- und Southern Blot Analysen können Transformanten, die invertierte T-DNAs an einem Locus aufweisen, nicht immer erkannt werden. Anhand zusätzlicher Restriktions- und Southern Blot Analysen und PCR Analysen konnten für die T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 und mGFP 1xr 127 invertierte T-DNAs nachgewiesen werden, die in Abbildung 3.3 dargestellt sind. PCR Analysen mit spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zur genomischen DNA sind, die die T-DNA flankiert und dem Oligonukleotid für die linke Border der T-DNA ergab für beide Transformanten ein Amplifikat. Durch Southern Blot Analysen konnte für die Transformante mGFP 1xr 127 in der NPT Hybridisierung lediglich in der Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI/BglII* ein zweites Fragment erhalten werden, welches auf das Vorliegen von zwei T-DNAs hindeutet. Die flankierenden genomischen Fragmente, die in der NPT Hybridisierung für die verwendeten Restriktionsenzyme *EcoRI/BamHI* nachgewiesen wurden, scheinen sich zu entsprechen. Die HPT und RB Hybridisierung ergibt für die Restriktionsenzyme *EcoRI/BglII* bzw. *EcoRI/BamHI* die erwarteten T-DNA spezifischen Fragmente von 2,2 und 3,0 kb und zudem Fragmente, deren Größen von 3,4 bzw. 2,0 kb auf das Vorliegen der RB-RB invertierten Orientierung der T-DNAs hindeuten (Abb. 3.3 A). Das Fragment von 0,7 kb konnte aufgrund einer zu langen gelelektrophoretischen Auftrennung nicht mehr auf dem Southern Blot erhalten werden. Vergleichbare Analysen wurden für die Transformante GUS 1xr rDNA 101 erhalten (Abb. 3.3 B).

A mGFP 1xr 127



B GUS 1xr rDNA 101

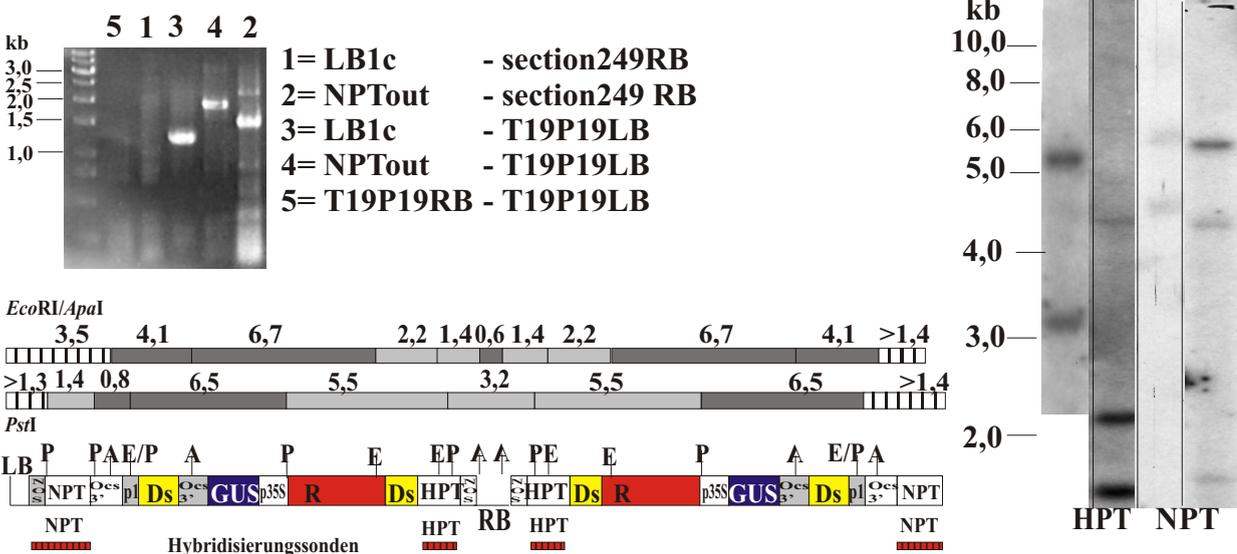


Abb. 3.3 Southern Blot und PCR Analyse der Transformanten mGFP 1xr 127 (A) und GUS 1xr rDNA 101 (B)

Genomische DNA wurde mit *EcoRI/BamHI* (E/Ba) und *EcoRI/BgIII* (E/Bg) (A) bzw. *PstI* (P) und *EcoRI/BgIII* (E/Bg) gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gelblottet. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach Hybridisierung der Membranen mit den radioaktiv markierten Fragmenten NPT und HPT. Restriktionskarten mit den resultierenden Fragmentgrößen (A: *ApaI*, E: *EcoRI*, P: *PstI*, Ba: *BamHI*, B: *BgIII*) und die entsprechenden Sonden sind neben den Autoradiogrammen dargestellt. Die schraffierten Fragmente detektieren sowohl *A. thaliana*- als auch T-DNA-Sequenzen. Die grauen können mit den verwendeten Sonden nicht markiert werden (s. schematische Abbildungen). Für PCR Ergebnisse sind jeweils der T-DNA spezifische Primer und der für die flankierende genomische DNA spezifische Primer angegeben. Es wurden homozygote Pflanzen analysiert. (schematische Darstellung in C)

3.2 Analyse der T-DNA Integration im Pflanzengenom

Die Amplifizierung der T-DNA flankierenden Sequenzbereiche der transgenen Linien erfolgte durch iPCR (Ochman *et al.*, 1988) (vergl. Abb. 2.1.A und Abb. 2.2). Die Sequenzen wurden ermittelt und mit der Sequenz des *Arabidopsis*-Genoms verglichen, um den Integrationsort der T-DNA zu bestimmen. Für jeden *A. thaliana* T-DNA Integrationsort wurden Oligonukleotide entwickelt, die spezifisch für diese Sequenz waren. Diese wurden in Kombination mit T-DNA spezifischen Oligonukleotiden der RB bzw. der LB für die PCR eingesetzt (vergl. Abb. 2.1.B).

Für alle transgenen Linien, in denen Sequenzinformationen für die an die LB und RB angrenzenden genomischen *A. thaliana* Bereiche erhalten werden konnten, wurden die T-DNA Integrationen detailliert untersucht. Es wurde analysiert wie genau die Insertion der Bordersequenzen erfolgte, ob im Verbindungsbereich T-DNA/Pflanzen-DNA zusätzliche Sequenzen inseriert waren und ob die Integrationsstelle von kleineren Chromosomenumordnungen (z.B. Deletionen) betroffen war.

Diese Analysen können für die T-DNA flankierenden Bereiche folgende Ergebnisse aufweisen:

- I Bestätigung beider T-DNA flankierender genomischer Bereiche (Matsumo *et al.*, 1990, Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991, Ohaba *et al.*, 1995)
- II Bestätigung eines T-DNA flankierenden genomischen Bereichs, während der andere Translokationen (Nacry *et al.*, 1998, Laufs *et al.*, 1999) oder Ti-Plasmidsequenzen (Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991 und Hermann *et al.*, 1991) enthalten kann.
- III Ermittlung von Ti-Plasmidsequenzen durch iPCR eines T-DNA flankierenden Bereiches, für den anderen konnte kein iPCR Amplifikat erhalten werden.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die T-DNA Integration in Gene erfolgt oder in die Nähe zu repetitiven Elementen erfolgt war. Die chromosomale Verteilung der T-DNA Integrationen wurde ebenfalls untersucht.

3.2.1 Kartierung der T-DNA flankierenden Bereiche von transgenen *A. thaliana* Pflanzen

In der Regel das Enzym *Bst*YI zur Restriktion verwendet, um geeignete Zirkel für die iPCR zu erhalten. Dieses Enzym erkennt eine degenerierte Hexanukleotidsequenz (PurimidinGATCPyrimidin). Wurde in der iPCR kein Fragment erhalten, wurden die *Bst*YI Restriktionsansätze mit der Restriktionsendonuklease *Bc*II nachbehandelt, ligiert und zur PCR verwendet. Die Kombination der Restriktionsenzyme *Bst*YI und *Bc*II ergibt Fragmente mit identischen Endpunkten (GATC). Durch die Verwendung von zwei Restriktionsenzymen entstehen durchschnittlich kleinere Fragmente, die geeigneter zur PCR Amplifikation sind. Wurde weiterhin in der PCR Reaktion kein Fragment erhalten, wurden weitere

Restriktionsenzyme (vergl. Abb. 2.2) verwendet. Tabelle 3.4 faßt die Ergebnisse der iPCR-Experimente zusammen.

verwendete Restriktionsenzyme	Anzahl der untersuchten Pflanzenlinien	iPCR Fragmente der RB	iPCR Fragmente der LB	keine iPCR Fragmente
<i>Bst</i> YI	150	54	53	43
<i>Bcl</i> II/ <i>Bst</i> YI	53	6	13	34
<i>Xba</i> I	5	1	-	4
<i>Apa</i> I	5	-	-	5
<i>Pst</i> I	8	-	-	8
<i>Pvu</i> II	8	-	-	8

Tabelle 3.4 Ergebnisse der erhaltenen iPCR Fragmente T-DNA flankierender Sequenzen

Es ist zu beachten, daß für einige T-DNA Pflanzenlinien iPCR Fragmente für die linke und rechte Border erhalten wurde. Die DNA einiger transgener Linien wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt, und es wurden in einigen Fällen verschiedene Fragmente erhalten.

Zur iPCR wurden 150 T-DNA Pflanzenlinien verwendet. Insgesamt wurden für 128 transgene Linien ein iPCR Fragment erhalten, welches einer Effizienz von 85% entspricht.

Ti-Plasmidsequenzen eines T-DNA flankierenden Bereichs konnten durch iPCR Analysen für 11 Transformanten erhalten werden, während für den anderen Bereich kein iPCR Fragment erhalten wurde. Von den verbleibenden 116 T-DNA flankierenden Bereichen konnte in 116 Fällen in der TAIR Datenbank Homologie zum *Arabidopsis* Genom ermittelt werden, welches einer Effizienz von 99% entspricht. Die erhaltene iPCR Sequenz der Transformante GUS 1xf 57 zeigte in den Datenbank Analysen keine Homologie. Ein Artefakt konnte ausgeschlossen werden, da das iPCR Fragment die erwarteten T-DNA Sequenzen aufwies.

Für 77 (65%) von 116 Transformanten konnten beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden. Von diesen 77 Transformanten wurden 73 zur weiteren Analyse in Kapitel 3.2.2 verwendet, da in vier Fällen die Qualität der Sequenzen keine genauen Charakterisierungen der Integrationsstelle zuließ.

Die molekularen Analysen und Sequenzanalysen transgener Linien, deren Integrationsort nur für einen flankierenden genomischen *A. thaliana* Bereich mittels PCR bestätigt werden konnte, sind in Kapitel 3.2.3 aufgeführt.

3.2.2 Sequenzanalysen transgener Linien, deren T-DNA Integrationsorte für beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden konnten

3.2.2.1 Sequenzanalyse der T-DNA Bordersequenzen kartierter Transformanten

Im Verlauf der T-DNA Integration in das Pflanzengenom kommt es in *Agrobacterium tumefaciens* zu einem strang- und positionsspezifischen Schneiden der 24 bp direkten Sequenzwiederholungen der rechten und linken T-DNA Border (Albright *et al.*, 1987, Wang *et al.*, 1987 und Dürrenberger *et al.*, 1989). Daher sollte eine vollständig im Genom integrierte T-DNA 2 bp der RB und 22 bp der LB besitzen (Pansegrau und Lanka, 1991).

T-DNA Bordersequenzen werden innerhalb des Transformationvorgangs in das Pflanzengenom häufig im Bereich dieser direkten Sequenzwiederholungen deletiert (Hiei, *et al.*, 1994; Gheysen *et al.*, 1991, Matsumoto *et al.*, 1990, Mayerhofer *et al.*, 1991). Zur umfassenden Analyse der Integrationsgenauigkeit der T-DNA im Pflanzengenom hinsichtlich der Bordersequenzen wurden die Sequenzen von 73 T-DNA Einzelkopie Linien miteinander verglichen (vergl. Anhang Tab. 6.2 und 6.3).

Zum Vergleich wurden Bordersequenzen des zur Transformation verwendeten Ti-Plasmides herangezogen, welche die 24 bp direkten Sequenzwiederholungen sowie angrenzende T-DNA Sequenzbereiche enthalten. Nukleotide, die nicht eindeutig der T-DNA oder der genomischen Sequenz zugeordnet werden konnten, wurden in dieser Analyse als T-DNA Bordersequenzen gewertet. Abbildungen 3.4 und 3.5 fassen die anhand dieser Analyse ermittelten Daten zusammen.

Die Integrationsgenauigkeit der Bordersequenzen der T-DNAs im Pflanzengenom ergab eine Einteilung in zwei Klassen. Klasse eins enthält zuzüglich des angrenzenden T-DNA Bereichs noch ein bis 22 bp der LB bzw. ein bis zwei bp der RB. Klasse zwei enthält keine LB bzw. RB Sequenzen und in den meisten Fällen Deletionen in den angrenzenden T-DNA Bereichen.

18 (23%) Transformanten weisen keinerlei Deletionen der LB 22 bp auf, während 13 (18%) Transformanten die 2 bp RB vollständig integriert haben. 45 (62%) bzw. 5 (7%) Transformanten besitzen Teilbereiche der 22 bp bzw. 2 bp der direkten Sequenzwiederholungen des linken bzw. rechten Borderbereiches.

Klasse zwei enthält 10 (14%) bzw. 55 (75%) T-DNA Linien, die eine komplette Deletion der 22 bp bzw. 2 bp und teilweise weiterer Nukleotide des angrenzenden T-DNA Bereiches aufweisen. Die Größe der Deletionen variiert von einem bis 242 bp (LB: GUS 1xr pAL 27) bzw. von einem bis 165 bp (RB: G/S/GFP r 110).

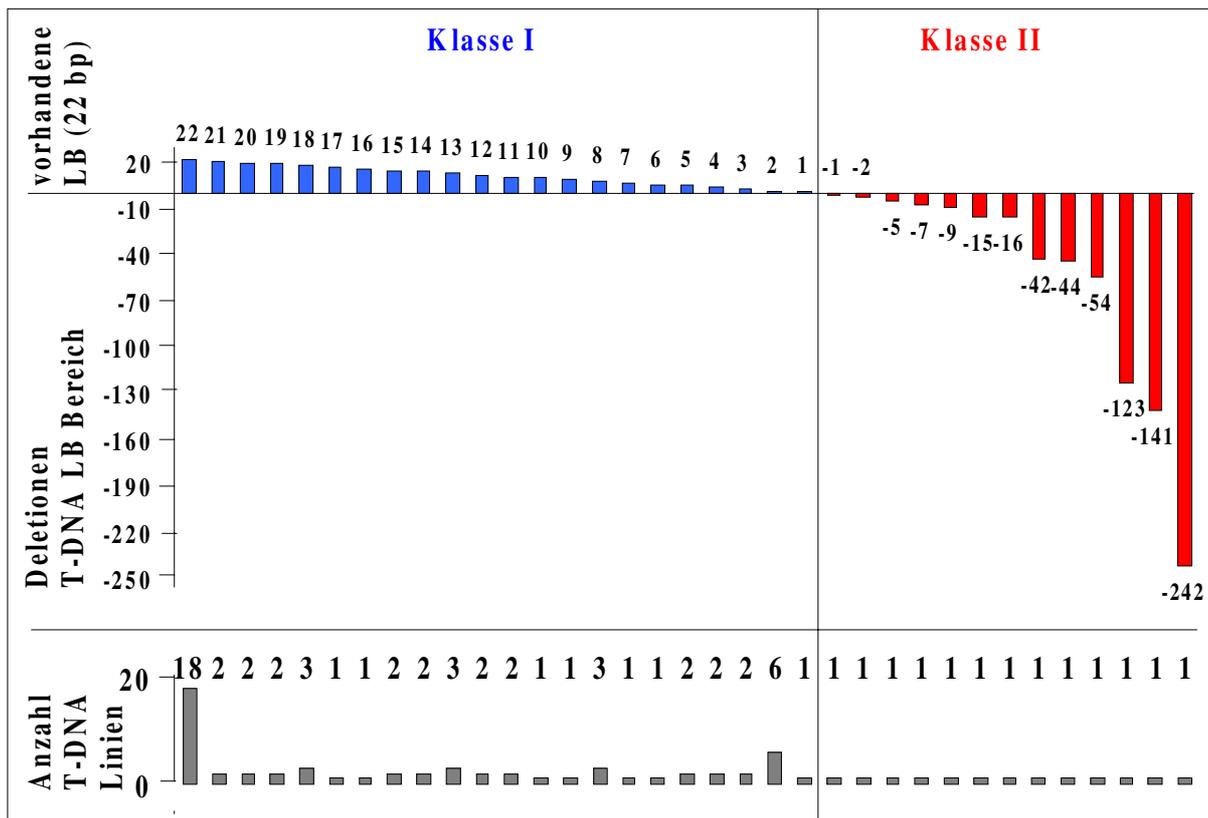


Abb. 3.4 Integrationsgenauigkeit des linken Borderbereiches der T-DNA

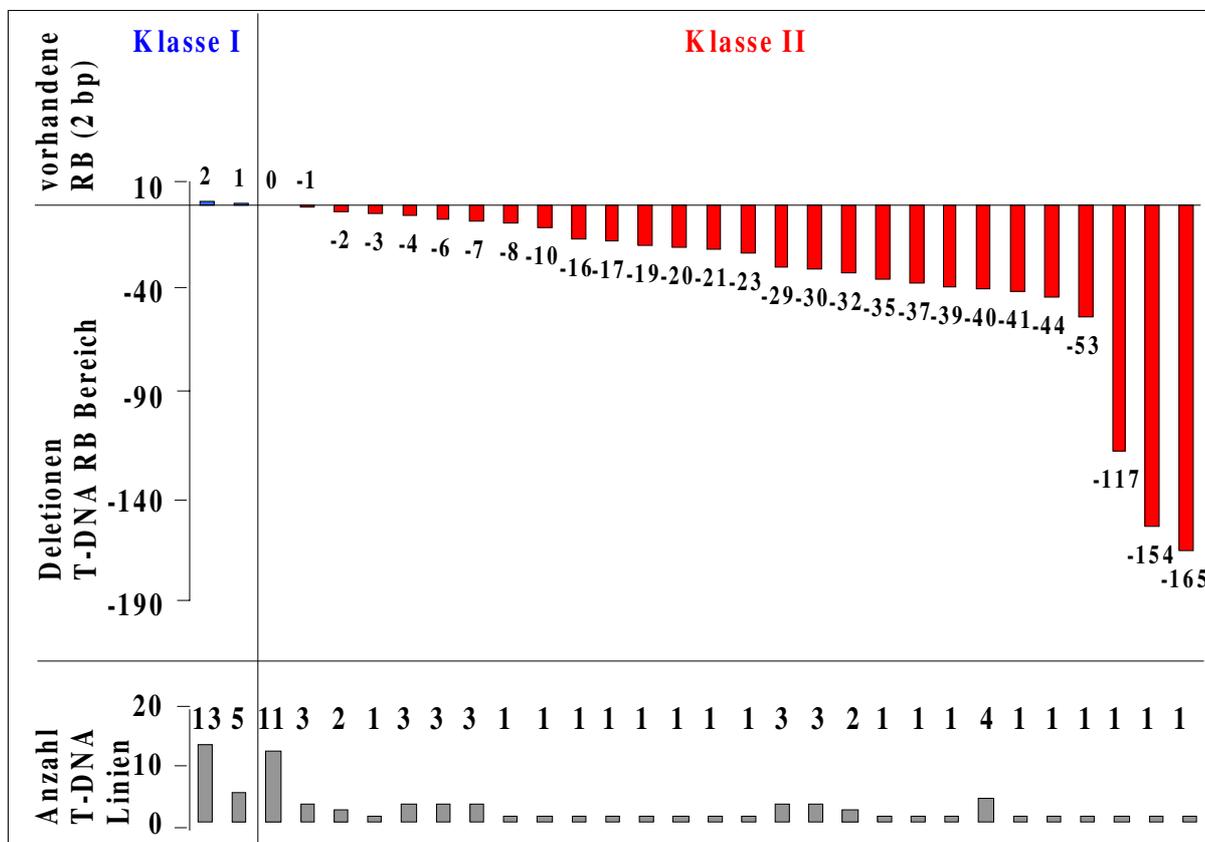


Abb. 3.5 Integrationsgenauigkeit des rechten Borderbereiches der T-DNA

Abb. 3.4/ 3.5 Integrationsgenauigkeit des linken (3.4) bzw. des rechten (3.5) Borderbereiches der T-DNA
 Dargestellt ist die Auswertung des Sequenzvergleiches (vergl. Tabelle 6.2) der LB-Sequenzen und RB-Sequenzen kartierter T-DNAs von 73 Transformanten.
 Die Einteilung der T-DNA Linien erfolgte in zwei Klassen, die sich in der Darstellung durch blaue (Klasse I) und rote (Klasse II) Balken unterscheiden.
 Transformanten, deren Borderbereich zuzüglich der angrenzenden T-DNA Sequenzen noch Teile der 22 bp langen LB bzw. der 2 bp langen RB enthält, sind blau dargestellt. Alle anderen Transformanten sind rot dargestellt. Die Anzahl der noch vorhandenen bp der Borderbereiche bzw. der deletierten bp der angrenzenden T-DNA Bereiche sind angegeben.
 Die Anzahl der Transformanten, für die dies beobachtet wurde, sind im Balkendiagramm dargestellt.

3.2.2.2 Sequenzanalyse des Verbindungsbereichs T-DNA/Pflanzen-DNA kartierter Transformanten

Die Verbindungsbereiche der T-DNA mit der genomischen Pflanzen-DNA können in den Transformanten zusätzliche DNA Sequenzen, sogenannte „*filler*“ DNAs enthalten. In einigen Fällen konnten einzelne Nukleotide nicht eindeutig der Pflanzen-DNA oder der T-DNA zugeordnet werden, da die Sequenzen in diesem Bereich identisch sind (= identische Nukleotide). Liegen im Verbindungsbereich *filler* DNAs oder identische Nukleotide vor, werden diese Bereiche als unpräzise bezeichnet. Sind solche Veränderungen nicht zu beobachten, werden die Verbindungsbereiche als präzise benannt. (Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991).

Zur Ermittlung der Häufigkeit von Veränderungen im Verbindungsbereich T-DNA/Pflanzen-DNA wurden die Sequenzen von 73 kartierten Transformanten analysiert, für die beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche durch PCR bestätigt werden konnten. Die Sequenzen der PCR-Fragmente wurden mit der Sequenz des zur Transformation verwendeten Ti-Plasmides und der genomischen *Arabidopsis*-DNA verglichen.

Unpräzise Verbindungsbereiche T-DNA/Pflanzen-DNA konnten für 86% (LB) und für 95% (RB) der Transformanten gezeigt werden (Tab. 3.5). Diese wiesen zu 58%/ 60% (LB/ RB) zusätzliche DNA-Sequenzen auf. Die *filler* DNA dieser Transformanten besitzen zu 81% (LB: 34 T-DNA Linien) bzw. 73% (RB: 32 T-DNA Linien) eine Länge von 3 bis 40 bp. Lediglich 19% (LB) bzw. 27% (RB) weisen im Verbindungsbereich eine höhere Länge der *filler* DNA auf. In den Analysen mit den TAIR und NCBI BLAST Datenbanken konnte keine Homologie der *filler* DNA zu den dort vorhandenen Sequenzen gefunden werden.

Identische Nukleotide der T-DNA und der Integrationsstelle wurden sowohl für den relativ zur T-DNA rechten als auch linken Verbindungsbereich mit 38% (LB) bzw. 25% (RB) in Form von ein bis sechs bp gefunden, wobei die meisten (68% LB/ 78% RB) eine Länge von ein bzw. zwei bp besitzen.

Für 3 (4% LB) bzw. 11 (15% RB) transgene Linien konnte eine präzise Verbindung zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA, die keine *filler* Sequenzen oder identische Nukleotide enthielt, erhalten werden (Tab. 3.5).

T-DNA/ Pflanzen-DNA Verbindung	präzise Verbin- dung	unpräzise Verbin- dung			unpräzise Verbin- dung			GESAMT
		filler DNA			identische Nukleotide			
LB	3 (4%)	42 (58%)			28 (38%)			73
RB	11 (15%)	44 (60%)			18 (25%)			73
		filler DNA	T-DNA Linien LB	T-DNA Linien RB	identische Nukleotide	T-DNA Linien LB	T-DNA Linien RB	
		1-10 bp	17	12	1 bp	13	7	
		11-20 bp	9	7	2 bp	6	7	
		21-30 bp	4	9	3 bp	6	1	
		31-40 bp	4	4	4 bp	-	2	
		41-50 bp	1	4	5 bp	2	1	
		51-60 bp	2	1	6 bp	1	-	
		61-70 bp	-	1	7 bp	-	-	
		71-80 bp	3	1				
		111-120 bp	1	-				
		131-140 bp	-	2				
		151-160 bp	-	1				
		200-300 bp	1	2				

Tabelle 3.5 Darstellung der Sequenzanalyse des Verbindungsbereiches T-DNA/*Arabidopsis* DNA der analysierten Transformanten
 Dargestellt ist die erhaltene Gesamtanzahl an Transformanten, die eine präzise Verbindung oder eine unpräzise in Form von *filler* DNA oder identischen Nukleotiden enthalten.
 Die Länge der *filler* DNA und die Zahl der identischen Nukleotide wurde im Verhältnis zu der Anzahl der Transformanten weiter aufgeschlüsselt.

3.2.2.3 Sequenzanalyse des T-DNA Integrationsortes kartierter Transformanten

Die Integration der T-DNA kann mit kleineren Deletionen innerhalb des Integrationsortes verbunden sein (Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991). Dies wurde im folgenden anhand von 73 Transformanten untersucht. Durch T-DNA Integration hervorgerufene Deletionen in Integrationsbereich der Pflanzen-DNA wurden in 93% der transgenen Linien detektiert.

Tabelle 3.6 enthält die Auflistung der Deletionen innerhalb der genomischen DNA, die eine Verteilung von zwei bis 960 bp aufweisen. Die meisten Deletionen (74%) liegen zwischen einem und 40 bp. Nur zwei (3%) der 73 analysierten Transformanten wiesen keine Deletion auf. Bei drei (4%) der 73 analysierten Transformanten konnte ein Nukleotid nicht eindeutig dem linken oder rechten flankierenden Bereich der T-DNA zugeordnet werden.

T-DNA Linie	Deletion bp	T-DNA Linie	Deletion bp	T-DNA Linie	Deletion bp
GUS 2xr 123	0	GUS 1xr rDNA 104	17	GUS 2xf 109	33
GUS 1xr 164 113	0	G/S/GFP f 144	19	GUS 1xr pAL 102	38
SPT 2xf 104	2	GUS S/AS f 102	20	mGFP 1xf 18	41
G/S/GFP r 110	2	GUS 2xf 113	20	GUS 1xr pAL 101	41
GUS 2xf 101	3	GUS AS r 107	20	SPT/GUS f 122	45
GUS 1xr 163 138	3	G/S/G r 129	20	GUS 3xf 122	46
GUS S/AS f 112	3	G/S/G r 114	21	GUS 1xr 163 135	47
SPT 3xf 139	3	mGFP 1xr 129	22	SPT 2xf 107	49
SPT 1xr 107	7	GUS 1xr pAL 27	22	GUS 2xf 20	56
G/S/GFP r 115	7	SPT/GUS f 110	22	GUS 1xr 502 111	58
GUS 1xf 110	11	GUS 1xr 18	23	GUS 1xr pAL 103	60
GUS 1xr 502 119	12	G/S/G r 125	24	GUS 1xf 30	72
GUS 1xr 69	13	G/S/GFP f 130	24	GUS S/AS f 140	90
Δ GUS 2a 117	13	GUS 1xr rDNA 24	25	SPT 3xf 103	93
GUS 1xr 105	13	GUS 2xr 126	25	GUS 3xf 112	94
GUS S/AS f 145	13	G/S/GFP f 126	25	GUS 1xf 60	98
GUS 2xr 125	14	SPT/GUS f 102	27	SPT 2xf 110	122
GUS 3xr 103	14	GUS 1xf 30	28	GUS 1xr pAL 126	301
mGFP 1xr 111	14	G/S/G f 125	29	SPT/GUS f 104	315
G/S/G f 133	14	SPT 2xf 129	29	Δ GUS 112	509
GUS 3xr 105	16	SPT 3xf 108	29	G/S/G f 136	960
GUS 3xf 118	16	GUS 3xr 130	30		
SPT 3xf 147	16	GUS 1xr 30	31	T-DNA Linie	Ident. Nuk.
GUS 1xr 501 116	17	SPT 3xf 154	31	mGFP 1xf 8	1
GUS 1xr pAL 42	17	SPT/GUS f 100	32	GUS 1xr 502 122	1
				SPT/GUS f 114	1

Tabelle 3.6 Sequenzanalyse des *A. thaliana* T-DNA Integrationsortes

Abkürzungen: ident. Nuk.: identische Nukleotide

Dargestellt sind die Deletionen der T-DNA Linien, die durch den Sequenzvergleich der *A. thaliana* DNA vor und nach der T-DNA Integration analysiert wurden. In drei Linien konnte eines der Nukleotide nicht eindeutig der relativ zur T-DNA linken bzw. rechten Sequenz zugeordnet werden.

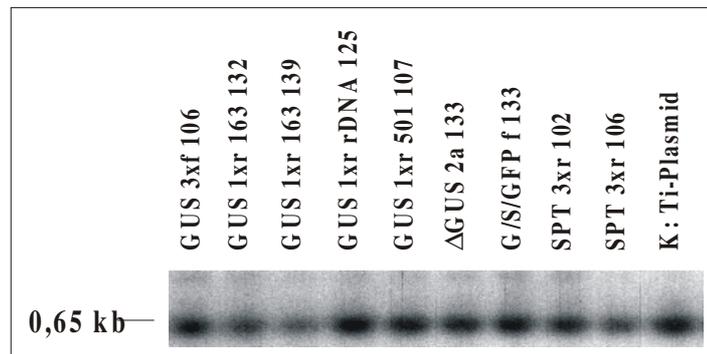
3.2.3 Sequenz- und molekulare Analyse transgener Linien, deren T-DNA Integrationsorte nur für einen flankierenden genomischen Bereich mittels PCR bestätigt werden konnten

Transgene Linien, deren T-DNA Integrationsorte im Genom mittels PCR nur für einen T-DNA flankierenden genomischen Bereich bestätigt werden konnte, wurden weiteren molekularen Analysen unterzogen. Der zweite T-DNA flankierende Bereich kann Veränderungen wie Translokationen (Nacry *et al.*, 1998, Laufs *et al.*, 1999) oder Ti-Plasmidsequenzen (Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991 und Hermann *et al.*, 1991) aufweisen.

3.2.3.1 Detektion von Ti-Plasmid Sequenzen

Die Detektion von Ti-Plasmidsequenzen ist durch Southern Blot Analysen, PCR und iPCR Analysen möglich. In den Southern Blot Analysen (Daten nicht dargestellt) können diese durch eine Sonde aus Ti-Plasmidsequenzen detektiert werden. Zur PCR Analyse von Ti-Plasmidsequenzen wurden Oligonukleotide ermittelt, die zu Sequenzen im Ti Plasmid korrespondieren, die ca. 650 bzw. 800 bp von der LB bzw. RB entfernt sind. Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch die in einigen transgenen Pflanzen durch PCR nachgewiesene Ti-Plasmidsequenzen.

Abb. 3.6 PCR Analyse zur Detektion von zur LB benachbarten Ti-Plasmidsequenzen in Transformanten
Die erhaltenen PCR Amplifikate wurden auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer Ti-Plasmid LB Sonde hybridisiert. Dargestellt ist der entsprechende Autoradiogrammausschnitt



Weiterhin konnten durch iPCR Analysen für die transgenen Linien GUS 2xf 23, GUS 3xf 103, SPT 2xr 101 und SPT 3xf 162 Ti-Plasmidsequenzen identifiziert werden. Interessanterweise liegen diese in den verwendeten Ti-Plasmiden nicht benachbart zu den Bordersequenzen. Daher können diese durch die durchgeführten Southern Blot oder PCR Analysen nicht nachgewiesen werden. Die T-DNA Linien SPT 1xr 130, SPT 2xr 103 und GUS 1xr 502 148 zeigten in den flankierenden Sequenzbereichen Homologie zu internen Bereichen der T-DNA (SPT 1xr 130: Ds Element bzw. SPT 2xr 103 und GUS 1xr 502 148: Tn5 Region (MCS vor dem P1' Promotor) des zur Transformation verwendeten binären T-DNA-Vektors (vergl. Abb. 3.1)).

Tabelle 3.7 enthält eine Zusammenstellung der Transformanten, für die Ti-Plasmidsequenzen nachgewiesen werden konnten. Insgesamt wurden in 39 (30%) von 129 Transformanten Ti-Plasmidsequenzen innerhalb der T-DNA flankierenden Sequenzbereiche ermittelt.

Southern Blot Analyse		PCR		iPCR	
LB	RB	LB	RB	LB	RB
GUS 3xr 100 GUS 3xr 126 GUS 1xr 502 153	GUS 3xf 113	GUS 3xf 106 GUS 1xr 163 132 GUS 1xr 163 139 GUS 1xr rDNA 125 GUS 1xr 501 107 Δ GUS 2a 133 G/S/GFP f 133 SPT 1xr 124	GUS 1xf 117 GUS 3xr 103 G/S/GFP r 137 GUS 1xr rDNA 117 Δ GUS 102 GUS AS r 101 G/S/GFP r 126 G/S/GPF f 151 GUS 2xr 133 SPT 1xr 103	GUS 2xf 23* GUS 3xf 101* SPT 1xr 130" SPT 2xr 101* SPT 3xr 102 SPT 3xr 106 SPT 3xf 100 mGFP 1xr 155	SPT 1xr 76 SPT 1xr 109 SPT 2xr 103" SPT 3xf 162* mGFP 1xf 128 mGFP 1xr 145 GUS 1xr 502 148" G/S/G r 118 Δ GUS 111

Tabelle 3.7 Detektion von Ti-Plasmidsequenzen innerhalb der flankierenden T-DNA Sequenzbereiche transgener Pflanzen

Angegeben sind die verwendeten Methoden zum Nachweis von Ti-Plasmidsequenzen in transgenen Linien. In der Regel wurden die Ti-Plasmidsequenzen ermittelt, die innerhalb des Ti-Plasmides direkt an die 24 bp RB und LB Sequenzen der T-DNA angrenzen

Die mit * markierten Transformanten enthalten in den flankierenden Sequenzbereichen der T-DNA Ti-Plasmidsequenzen, die im Ti-Plasmid nicht direkt an die RB und LB Sequenzen angrenzen.

Die mit " markierten Transformanten enthalten in den flankierenden Sequenzbereichen der T-DNA Homologien zu internen Bereichen der T-DNA.

3.2.3.2 PCR Analyse zur Detektion von Transformanten mit zwei T-DNAs, die in invertierter Orientierung an einem Locus vorliegen

Transformanten, deren Integrationsort nur für einen T-DNA flankierenden genomischen Bereich bestätigt werden konnte und die innerhalb des anderen keine Ti-Plasmidsequenzen aufwiesen, wurden auf das Vorliegen von zwei T-DNAs an einem Locus überprüft. Diese können mit den verwendeten Southern Blot Analysen nicht erkannt werden, wenn sich die Größen der beiden flankierenden genomischen Bereiche für die verwendeten Restriktionsenzyme entsprechen. Die zur Integrationsstelle korrespondierenden genomischen Oligonukleotide wurden dazu in Kombination mit verschiedenen Oligonukleotiden beider T-DNA Borderbereiche verwendet.

Anhand dieser PCR konnten für sieben Transformanten zwei T-DNAs an einem Locus in invertierter Orientierung identifiziert werden. Die T-DNAs der Transformanten SPT 1xr 83, SPT 3xf 159, GUS 1xr rDNA 101, mGFP 1xr 127, G/S/G r 120 und SPT/ GUS r 102 liegen in RB-RB invertierter Orientierung vor. Die T-DNAs der Transformante G/S/G r 119 liegen in LB-LB invertierter Orientierung vor. Die komplexe Integration der T-DNAs der Transformanten GUS 1xr rDNA 101 und mGFP 1xr 127 wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand von Southern Blot Analysen bestätigt (vergl. 3.1.4.3). Die komplexe Integration der T-DNAs der Transformanten SPT 1xr 83 und SPT 3xf 159 wurden durch D. Schubert (unveröffentlicht) anhand von Southern Blot Analysen bestätigt.

3.2.3.3 Detektion zusätzlicher unvollständiger T-DNA Borderbereiche mittels iPCR

Anhand der iPCR Analysen konnten für zwei Transformanten neben dem T-DNA Integrationsort zusätzliche T-DNA Borderbereiche detektiert werden, die in den Southern Blot Analysen nicht ermittelt werden konnten. Für beide iPCR Produkte konnten nach erfolgter Sequenzierung 100%ige Homologien zum *Arabidopsis*-Genom ermittelt werden. In der Bestätigung der Integrationsorte konnte der genomische Integrationsort jeweils für ein iPCR Fragment für beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden. Für den zweiten Integrationsort konnte jeweils nur der zuvor durch iPCR ermittelte T-DNA flankierende genomische Bereich bestätigt werden.

Die Transformante SPT 2xf 101 enthält eine vollständige T-DNA Integration im *Arabidopsis*genom, die Position 22.000 des BACs T6K12 entspricht. Zusätzlich wurde eine Partialintegration der RB im *Arabidopsis*genom ermittelt (Position 69.500 des TACs K16L22). Die Transformante SPT 2xf 151 enthält eine vollständige T-DNA Integration an der Position 28.500 des BACs F13E7 korrespondierende Sequenz und eine Partialintegration der LB im *Arabidopsis*genom (Position 29.500 des TACs K11J9).

3.2.3.4 Analyse von möglichen Translokationsereignissen

Die Kartierung der T-DNA Einzelkopie Linie GUS 3xr 117 ergab innerhalb der iPCR Analysen zwei Integrationsorte, die für den relativ zur RB bzw. LB der T-DNA flankierenden genomischen *A. thaliana* Bereich auf unterschiedlichen Chromosomen zu finden sind. Diese konnten anhand weiterer PCR Analysen bestätigt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Transformanten G/S/G r 119, G/S/G r 120 und GUS 1xr rDNA 101 erhalten. Diese Linien besitzen invertierte T-DNAs und zeigten für beide T-DNA flankierenden genomischen Bereiche einen anderen Integrationsort. Es besteht daher der Hinweis, daß diese Transformanten Translokationen aufweisen.

Die Möglichkeit, daß es sich jeweils um ein unvollständiges Borderfragment der LB bzw. der RB handelt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.2.4 Chromosomale Verteilung von *A. thaliana* T-DNA Integrationen

Zur Analyse der Integration in ORFs, der Integration in oder in die Nähe repetitiver Elemente und der chromosomalen Verteilung von T-DNA Integrationen im *A. thaliana* Genom, wurden 105 Transformanten verwendet. Deren T-DNA Integrationsorte konnten entweder für beide T-

DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden oder diese konnten nur für einen Bereich bestätigt werden, während der andere Ti-Plasmid Sequenzen aufwies.

3.2.4.1 Sequenzanalyse von T-DNA Integrationen in annotierten Genen des *Arabidopsis*-Genoms

Die Verteilung der T-DNA Insertionen im Pflanzengenom erfolgt nicht gerichtet; sie kann folglich in Genen oder intergenischen Bereichen erfolgen (zusammengefaßt in Tinland, 1996). Zur Bestimmung der T-DNA Integration im *Arabidopsis* Genom innerhalb annotierter Gene wurde die BLAST Analyse der TAIR Datenbank in der Option „Genbank“ verwendet. Diese umfaßt alle *Arabidopsis*sequenzen sowie die ESTs, cDNA Klone und BAC Endsequenzen. Weiterhin wurde die Annotierung des BACs zur Ermittlung von T-DNA Integrationen in vorhergesagten Genen analysiert. Von 105 T-DNA Linien konnte für 33 (31%) eine Integration in einem annotierten Gen ermittelt werden, die Tabelle 3.8 zu entnehmen sind.

3.2.4.2 Sequenzanalyse von T-DNA Insertionen in repetitiven Elementen des *Arabidopsis* Genoms

Um festzustellen, ob T-DNA Insertionen in oder in der näheren Umgebung von repetitiven Elementen des *Arabidopsis* Genoms vorliegen, wurden die Annotierungen der entsprechenden BAC Positionen in der NCBI Datenbank überprüft bzw. die BLAST Analyse der TAIR Datenbank mit der Option CHSL verwendet, welche repetitive Sequenzen umfaßt.

Anhand dieser konnten von 105 kartierten Transformanten für zwei (2%) T-DNA Linien die Integration innerhalb eines repetitiven Elements und für 21 (20%) T-DNA Linien repetitive Elemente in der näheren Umgebung von 10 kb des relativ zur T-DNA rechten und linken genomischen *A. thaliana* Bereiches festgestellt werden (Tab. 3.9). Die Genompositionen der T-DNAs der Transformanten SPT 1xr 141 und GUS 2xr 126 ist aufgrund der Integration innerhalb eines repetitiven Elementes nicht zuzuordnen.

T-DNA Linien	ESTs/ cDNA Klone	Genvorhersagen	Funktionsvorhersage
GUS 1xr 105	ATU76670	keine Genvorhersage	recA-ähnliches Protein (AtDMC1)
SPT 2xf 107	keine ESTs/ cDNAs	K16L22.9	unbekanntes Protein
SPT 2xf 129	APZL41e02F, 3' Ende	keine Genvorhersage	unbekanntes Protein
GUS 2xf 151	keine ESTs/ cDNAs	F13E7.1	unbekanntes Protein
GUS 2xf 23	AA586014	MIK19.10	AA-Aminosäurehydrolase-Homolog
GUS 3xr 100	keine ESTs/ cDNAs	T12C14.120	Ähnlichkeit zum DNA bindendem Protein bZIP aus <i>Antirrhinum majus</i>
GUS 3xr 126	keine ESTs/ cDNAs	At2g28140	putatives MuDR-A-vergleichbares Transposon Protein
GUS 3xr 130	keine ESTs/ cDNAs	MAC9.8	Ähnlichkeit zu RNA bindenden Proteinen
GUS 3xf 112	RZ156b07F, 3' Ende	keine Genvorhersage	unbekanntes Protein
GUS 3xf 122	keine ESTs/ cDNAs	MYC6.13	unbekanntes Protein
GUS 2xf 109	AF096294	keine Genvorhersage	<i>A. thaliana</i> PR1 Protein (<i>pathogenesis related protein</i>)
GUS 2xf 110	keine ESTs/ cDNAs	MJM20.5	Ähnlichkeit zu NAM (no apical meristem) Protein
GUS 2xf 113	keine ESTs/ cDNAs	At2g31340	unbekanntes Protein
SPT 1xr 103	keine ESTs/ cDNAs	T6K22.80	hypothetisches Protein
SPT 1xf 124	keine ESTs/ cDNAs	F14I13.16	Ähnlichkeit zu ARC1 aus <i>Brassica napus</i>
SPT 3xf 103	AI998165/ 71515602	F10K1.21	Ähnlichkeit zu unbekanntem Protein F7A7_100
SPT 3xf 108	AI9972279	keine Genvorhersage	unbekanntes Protein
SPT 3xf 110	AI997405	T14E10_40	mögliche UMP Synthase
SPT 3xf 139	keine ESTs/ cDNAs	F27L4.9	unbekanntes Protein
SPT 3xf 154	AI995551	T5E8_80	Ähnlichkeit zum pollen major allergen, partial cup a 1 Protein aus <i>Cupressus arizonica</i>
SPT 3xf 159	ATHCB	MOP10.8	unbekanntes Protein
SPT 2xr 103	AB09C10	keine Genvorhersage	unbekanntes Protein
mGFP 1xr 129	ATU66344	keine Genvorhersage	<i>A. thaliana</i> calreticulin (Crt2) Gen
ΔGUS 102	ATU66344	At2g35430	hypothetisches Protein
ΔGUS 112	keine ESTs/ cDNAs	F14G11.11	unbekanntes Protein
ΔGUS 2a 117	keine ESTs/ cDNAs	F10C21.7	unbekanntes Protein
G/S/G f 133	keine ESTs/ cDNAs	30 bp entfernt MRC8.6	unbekanntes Protein
G/S/G f 136	keine ESTs/ cDNAs	MTI20.18	Phytoeyanin/ frühes Nodulin-ähnliches Protein
G/S/G r 125	keine ESTs/ cDNAs	MAE1.2	Nitrat Transporter
G/S/GFP f 130	AI995296	keine Genvorhersage	unbekanntes Protein
G/S/GFP f 133	keine ESTs/ cDNAs	To12.21	putative Transposase
GUS S/AS f 145	AI996607	MQB2.25	Ähnlichkeit zur Isoamyl -Azetathydrol-Esterase
GUS S/AS f 137	keine ESTs/ cDNAs	MQD19.18	unbekanntes Protein

Tabelle 3.8 Auflistung der T-DNA Linien, die in Gensequenzen vorliegen

Dargestellt sind die Akzessions-Nummern der für die T-DNA Integration ermittelten ESTs bzw. cDNA Klone bzw. die Genidentifikationsnummern der in der NCBI Datenbank ermittelten Genvorhersagen sowie deren mögliche Funktion.

T-DNA Linie	Entfernung zum Integrationsort	repetitives Element	Akzessionsnummer
ΔGUS 112	735	Mutator ähnliche Transposase	F26C24.7
	18899	Mikrosatellit repetitives <i>A. thaliana</i> Element	AT74A
ΔGUS 2a 117	7200	verteilt vorkommendes repetitives Element	ATREP2/ 3
GUS 1xf 117 ¹	9841	nicht autonomes Transposon T17C2	ATR0067
GUS 2xr 123 ²	6442	putatives del-ähnliches Retrotransposon T32N15	ATR0059
GUS 2xr 126 ²	0	<i>Athila</i> Retroelement X81801, X93611	ATR0033
GUS 3xr 100	6008	F2N1 repetitives Element	ATR0075
GUS 3xr 130 ²	2810	Mini-Satellit, 23 Kopien eines 28-bp tandem repetitiven Elements	ATR0058
GUS 3xf 122 ¹	4796	F2N1 repetitives Element 4	ATR0078
GUS 1xr 105 ²	4005	<i>Limpet1</i> Transposon	ATR0064
SPT/GUS f 100 ³	6450	T3F12 repetitives Element	ATR0053
G/S/G f 125 ³	59	<i>Limpet1</i> Transposon	ATR0064
G/S/G r 125 ³	3997	F2N1 repetitives Element 1	ATR0075
G/S/G r 129 ³	2089	Tag1 Transposon	ATR0042
G/S/GFP r 115 ³	443	F2N1 repetitives Element 3	ATR0077
mGFP 1xr 129	9518	F2N1 repetitives Element 1	ATR0075
GUS 1xr pAL 101	6089	Mini-Satellit, 23 Kopien eines 28-bp tandem repetitiven Elements	ATR0058
GUS 1xr 164 102	8718	T3F12 repetitives Element	ATR0053
GUS 1xr pAL 126	4069	T3F12 repetitives Element	ATR0053
GUS 1xr pAL 27	8944	T3F12 repetitives Element	ATR0053
GUS AS r 101	7967	T17A5 (AF024504) repetitives Element	ATR0055
SPT 2xr 103	9712	T3F12 repetitives Element	ATR0053
SPT 1xr 141 ²	0	<i>Arabidopsis thaliana</i> 25S-18S ribosomaler DNA Spacer	X15550
SPT 3xf 147 ²	9734	Mini-Satellit, 23 Kopien eines 28-bp tandem repetitiven Elements	ATR0058

Tabelle 3.9 Auflistung kartierter Transformanten, deren T-DNA in oder in der Nähe repetitiver Elemente im *A. thaliana* Genom integriert ist

Die Reporterogenaktivität der jeweiligen Transformanten wurde verglichen mit transgenen Linien, deren T-DNA das gleiche Konstrukt enthält. Die mit ¹ markierten T-DNA Linien wurden durch M. Gils (Diss., 2000), die mit ² markierten transgenen Pflanzen wurden durch D. Schubert (unveröffentlicht und Dipl., 1999) und die mit ³ markierten Linien durch B. Lechtenberg hinsichtlich ihrer Reporterogenaktivität analysiert (unveröffentlicht und Dipl., 1999). Alle weiteren Transformanten wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Reporterogenaktivität überprüft.

3.2.4.3 Chromosomale Verteilung der T-DNA Integrationen im *A. thaliana* Genom

Für 103 transgene Linien wurden die Positionen der T-DNAs auf der genetischen Karte von *A. thaliana* ermittelt (vergl. Abb. 3.7).

Die dem *Arabidopsis*-Integrationsort entsprechenden Sequenzpositionen wurden ermittelt und durch den Vergleich der Sequenzkarte und der genetischen Karte dem nächstgelegenen molekularen Marker zugeordnet. Die cM Position des molekularen Markers entspricht auf der genetischen Karte (Lister *et al.*, 1993) dem Integrationsort der T-DNA. (<http://www.arabidopsis.org/>). Detaillierte Angaben zur Sequenzanalyse der Integrationsorte sind Tabelle 6.4 (Anhang) zu entnehmen.

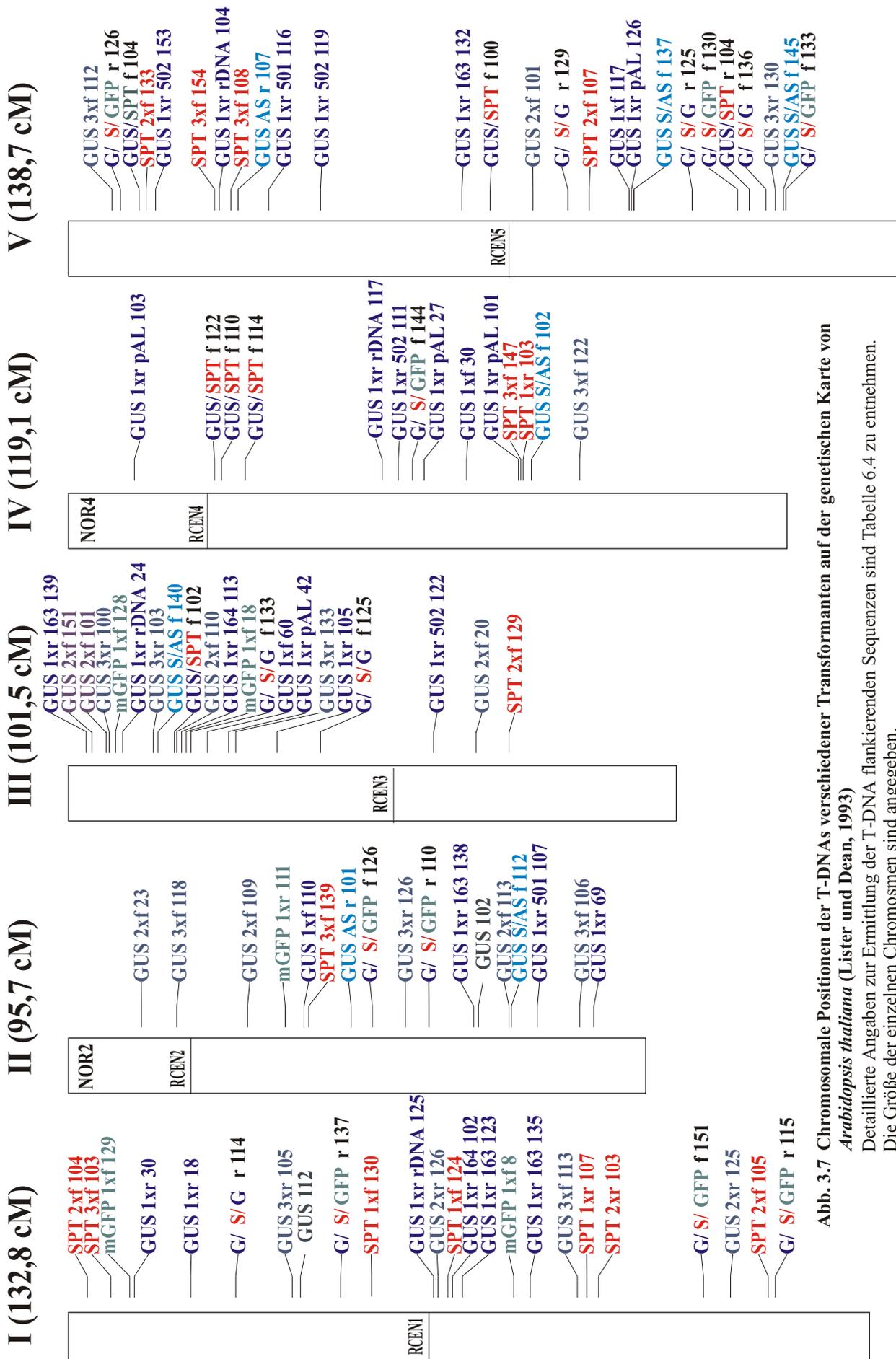


Abb. 3.7 Chromosomale Positionen der T-DNAs verschiedener Transformanten auf der genetischen Karte von *Arabidopsis thaliana* (Lister und Dean, 1993)

Detaillierte Angaben zur Ermittlung der T-DNA flankierenden Sequenzen sind Tabelle 6.4 zu entnehmen. Die Größe der einzelnen Chromosomen sind angegeben.

Abkürzungen: RCEN 1-5: Zentromere der Chromosomen, NOR2 bzw. NOR4: Nukleolusorganisatoren der Chromosomen 2 bzw. 4

3.3 Expressionsstudien der Reportergene

Um den Einfluß repetitiver Sequenzen auf die Transgenexpression zu untersuchen, wurden β -Glucuronidase Reportergenkonstrukte (GUS 1x *repeat*) etabliert, die in direkter Nachbarschaft zum CaMV 35S Promotor ein oder zwei Kopien eines repetitiven Elementes aus dem *A. thaliana* Genom tragen. Mit diesen wurden *A. thaliana* Pflanzen erstellt. Die vergleichende Expressionsanalyse dieser Linien erfolgte zu GUS 1x Pflanzen, deren T-DNA das GUS-Reportergen in einfacher Kopie trägt und die eine einheitlich hohe Expression aufweisen (M.Gils, 2000).

In vorherigen Studien zur Transgen-Expression wurde anhand von Northern Blot Analysen und GUS-Aktivitätstests untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der Transgenkopienzahl des β -Glucuronidasegens (GUS) und der Expression dieses Reportergens in *Arabidopsis thaliana* gibt. Pflanzen, die drei oder mehr Kopien des GUS-Gens unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors im Genom aufwiesen, zeigten Silencing aller GUS-Reportergenkopien. (M.Gils, 2000 und D. Schubert, 1999).

Um zu untersuchen, ob DNA-DNA Wechselwirkung durch homologe Sequenzbereiche die Ursache für Silencing ist, wurden promotorlose β -Glucuronidasegene in den Pflanzen etabliert. Diese wurden u.a. durch Kreuzungsexperimente in Linien eingebracht, die T-DNAs aufweisen, die ein (GUS 1x), zwei (GUS 2x) oder drei (GUS 3x) GUS-Reportergene tragen. Die Expressionsanalyse erfolgte vergleichend zu den T-DNA Linien GUS 1x, GUS 2x und GUS 3x. Silencing der T-DNA Linien mit mehr als drei GUS-Kopien sollte einer antisense Suppression gegenüber gestellt werden. Dazu wurden transgene Linien etabliert, die sowohl *antisense* als auch *sense* GUS Reportergene unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors tragen.

Zur Analyse der Fragestellungen wurden semiquantitative und quantitative β -Glucuronidase-Expressionsanalysen und Northern Blot Experimente durchgeführt.

Es wurden transgene Linien zur Analyse eingesetzt, die nur eine vollständige T-DNA im Genom aufweisen. Durch genetische Analysen wurden Linien etabliert, die die T-DNA homozygot tragen. Durch Kreuzung mit Wildtyppflanzen konnten in der Nachkommenschaft Pflanzen erhalten werden, die für den T-DNA Locus hemizygot sind.

Pflanzen, die das Reportergen β -Glucuronidase in ein- oder zweifacher Kopie enthalten, zeichnen sich durch eine hohe und einheitliche Transgen Expression aus (M. Gils, 2000). Um zu überprüfen, ob dies auch für andere Reportergene unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zutrifft, wurden Pflanzen untersucht, die das Reportergen GFP (*green fluorescent protein*) in ein- oder zweifacher Kopie enthalten.

3.3.1 β -Glucuronidase Expressionsanalysen

Die quantitative Messung der β -Glucuronidaseaktivität der transgenen Pflanzen erfolgte 2, 5 und 8 Wochen (2W, 5W, 8W) nach Auslegen der Samen (vergl. 2.2.14). Nach 2 wöchigem Wachstum in axenischer Kultur unter Langtagbedingungen wurden die transgenen Pflanzen in Erde und Kurztag transferiert. Pro T-DNA Linie wurden jeweils zwei Messungen von zwei Extrakten unterschiedlichen Blattmaterials junger Rosettenblätter erstellt. Dadurch ergeben sich pro T-DNA Pflanzenlinie vier Meßwerte, die zur Auswertung herangezogen wurden. Die Gesamtproteinkonzentration wurde ebenfalls pro Pflanzenextrakt doppelt gemessen. Der erhaltene Proteinmittelwert des jeweiligen Pflanzenextraktes wurde als Bezugsgröße in die Berechnung der Aktivitätsmeßwerte des entsprechenden Extraktes einbezogen. Der Mittelwert der vier GUS-Aktivitätswerte ergibt die GUS-Aktivität mit der entsprechenden Standardabweichung.

Wurden die F1 Nachkommen von Kreuzungen zwischen homozygoten Pflanzen, die unterschiedliche T-DNAs tragen, untersucht, erfolgte eine Überprüfung hinsichtlich der T-DNA Integrationsorte im *A. thaliana* Genom. Dazu wurde genomische DNA extrahiert und in einer PCR eingesetzt. Die dort verwendeten Oligonukleotide sind für den genomischen Bereich der T-DNA Integration jenseits der RB oder LB und den Bereich der rechten bzw. linken Border der T-DNA spezifisch (vergl. 2.5.13). Die erhaltenen PCR Fragmente zeigen die Präsenz der in den F1 Nachkommen vorhandenen T-DNAs.

Die semiquantitative Messung der β -Glucuronidaseaktivität der transgenen Pflanzen erfolgte ebenfalls für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Mit Hilfe dieser Methode können mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen transgenen Pflanzen einer Nachkommenschaft analysiert werden. Die Northern Blot Analysen der transgenen Pflanzenlinien wurden von 8 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

3.3.1.1 Ermittlung der Vergleichbarkeit der quantitativen GUS-Aktivitätsmessung transgener Pflanzen in unterschiedlichen Versuchsreihen und Generationen

Die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die in zwei Meßreihen der quantitativen β -Glucuronidase-Aktivitätsmessung erhalten wurden, wurde anhand verschiedener transgener Linien der GUS 1xr 163 T-DNA Transformanten überprüft. Pro Meßreihe wurden die verwendeten transgenen Linien zum gleichen Zeitpunkt ausgesät und nach 2, 5 und 8 Wochen in einem Experiment untersucht. Die T-DNA der GUS 1xr 163 Linien enthält in direkter Nachbarschaft zum CaMV 35S Promotor des β -Glucuronidase Reportergens das repetitive Element 163. Die weiterhin im Verlauf dieser Analysen verwendeten Transformanten enthalten in direkter Nachbarschaft das repetitive Element pAL (GUS 1xr pAL), 164, (GUS 1xr 164), 500 (GUS 1xr 501 (eine Kopie), GUS 1xr 502 (zwei Kopien)) oder den SallI rDNA Spacer (GUS 1xr

rDNA) (vergl. Abb. 3.1). In Abbildung 3.8 sind exemplarisch die GUS-Aktivitäten zwei verschiedener Meßreihen gegenübergestellt: Meßreihe 1 enthält den Vergleich von zwei verschiedenen transgenen *A. thaliana* Linien, mit der GUS 1xr 163 T-DNA. Für die T-DNA Linie GUS 1xr 163 132 wurden Pflanzen zwei verschiedener Generationen gemessen. Innerhalb der zweiten Meßreihe wurden die gleichen Linien gemessen. Die einheitlich hohe GUS-Aktivität der verschiedenen GUS 1xr 163 T-DNA Transformanten, die bereits der ersten Meßreihe zu entnehmen ist, konnte in einer zweiten Meßreihe bestätigt werden. Transgene Pflanzen der gleichen Generation (vergl. GUS 1xr 163 135-12-21-21 und GUS 1xr 163 135-12-21-22), verschiedener Generationen (vergl. GUS 1xr 163 132-11-22 und GUS 1xr 163 132-11-21-21-21) und unterschiedliche Transformanten weisen eine einheitliche GUS-Aktivität auf.

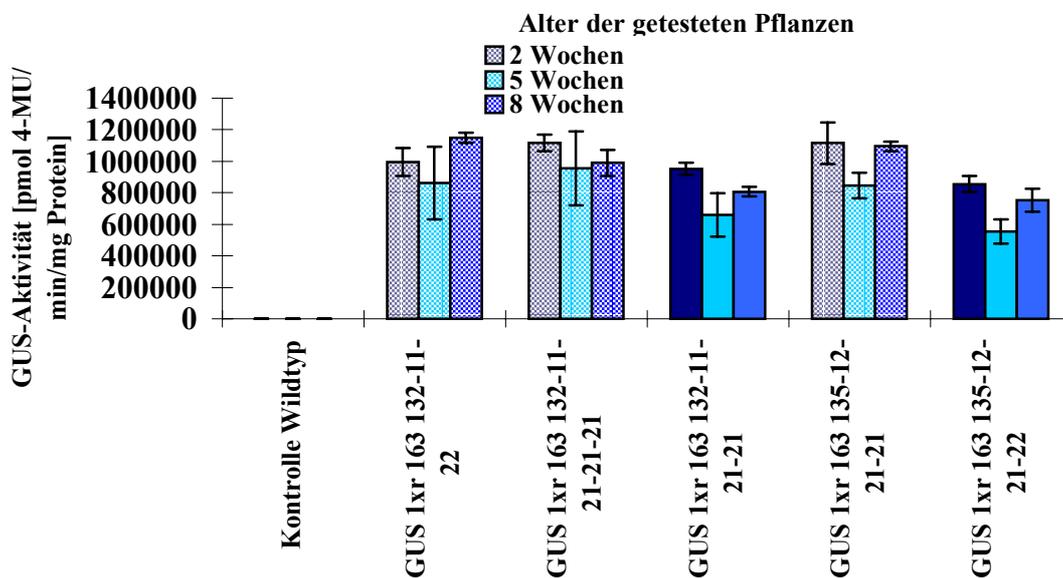


Abb. 3.8 Vergleich der β -Glucuronidase-Aktivität verschiedener Meßreihen der T-DNA Linien GUS 1xr 163 132 und GUS 1xr 163 135

Meßreihe 1 ist schraffiert dargestellt. Meßreihe 2 enthält keine Schraffierung.

Die Standardabweichungen, die sich aus beiden Messungen der Proteinextrakte ergeben, sind als Fehlerbalken angegeben. Jeweils zwei Extrakte wurden aus jungen Rosettenblättern von 5 bis 10 unterschiedlichen Pflanzen pro T-DNA Linie erstellt. Die Übertragung der Pflanzen von axenischer Kultur und Langtagbedingungen erfolgte nach zwei Wochen in Kurztagbedingungen und Erde.

Die GUS-Aktivität in transgenen Pflanzen wurde für weitere transgene Linien überprüft. In dieser Analyse wurden transgene Linien, die die T-DNAs GUS 1xr pAL, GUS 1xr 163, GUS 1xr 164, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502 und GUS 1xr rDNA (vergl. Abb. 3.1) enthalten, verwendet. In Tabelle 3.10 sind exemplarisch die GUS-Aktivitäten verschiedener Transformanten für Pflanzen mehrerer Generationen dargestellt. Die maximalen Abweichungen der GUS-Aktivitäten, die für Pflanzen verschiedener Generationen einer T-DNA Linie zu beobachten sind, besitzen einen Faktor von 2,0 (2 Wochen: GUS 1xr pAL 27-1-21-21-22-21/ T6 Generation und

GUS 1xr pAL 27-1-21-21-21-21/ T7 Generation). Eine Änderung der GUS-Aktivität der Transformanten im Verlauf von mehrfachen Pflanzengenerationen ist folglich nicht zu beobachten.

Linie	Alter	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7
GUS 1xr pAL 27				1-21-21	1-21-21-21	1-21-21-22-21	1-21-21-21-21-21
	2 W			888000	554000	564000	1112000
	5 W			472000	460000	474000	403000
	8 W			716000	897000	557000	476000
GUS 1xr 501 116		25	21-21	21-21-21		21-21-21-21-21	
	2 W	657000	542000	745000		1063000	
	5 W	375000	491000	596000		675000	
	8 W	420000	901000	996000		751000	
GUS 1xr 502 111				21-21-21	21-21-21-21	21-21-21-21-21	
	2 W			950000	1050000	616000	
	5 W			662000	880000	661000	
	8 W			883000	1039000	884000	
GUS 1xr rDNA 104		24	24-21	24-21-21			
	2 W	595000	773000	786000			
	5 W	512000	512000	481000			
	8 W	1046000	1088000	889000			
GUS 1xr 163 132			11-22	11-21-21	11-21-21-21		
	2 W		996000	953000	1111000		
	5 W		862000	661000	962000		
	8 W		1150000	850000	990000		
GUS 1xr 164 113				11-21-21	11-21-21-21		11-21-21-21-21-21
	2 W			981000	1196000		936000
	5 W			552000	630000		490000
	8 W			926000	894000		451000

Tabelle 3.10 Exemplarische Darstellung der quantitativen β -Glucuronidase Aktivitätstests homozygoter *A. thaliana* Linien, deren T-DNA die Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163 oder GUS 1xr 164 enthält.

Pflanzen verschiedener Generationen (T2 – T7) wurden analysiert.

Die Bezeichnung der jeweiligen Transformanten ist angegeben. Der Mittelwert von vier Messungen wurde ermittelt. Die erhaltenen Aktivitätswerte wurden gerundet. GUS-Aktivitäten wurden für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen bestimmt. Die Generationen nach erfolgter Transformation sind durch die Bezeichnung T2 bis T7 angegeben (T0 = transformierte Pflanze).

3.3.1.2 Expressionsanalysen der Pflanzen, deren T-DNAs repetitive Sequenzen in direkter Nachbarschaft zum 35S CaMV Promotor des β -Glucuronidase Reportergens enthalten

Tabelle 3.11 stellt exemplarisch die Ermittlung der β -Glucuronidase Aktivitätswerte anhand der fünf analysierten GUS 1xr 163 T-DNA Transformanten zusammen. Pro Pflanzenextrakt wurden zwei Messungen durchgeführt, deren Mittelwert in Tab. 3.11 hervorgehoben dargestellt ist. Für 2 Wochen alte Pflanzen wurde für die T-DNA Linie GUS 1xr 163 135-12-21-21 der geringste Wert ermittelt, während der höchste Wert für die T-DNA Linie GUS 1xr 163 123-22-21-21-21-21 gefunden wurde. Die verschiedenen Werte unterscheiden sich damit um den Faktor 1,1. Für 5 Wochen alte Transformanten wurden maximale Unterschiede von 1,6 beobachtet, während acht Wochen alte maximal um den Faktor 1,9 voneinander abweichen.

Linie	Messungen Extrakt I		Messungen Extrakt II		Mittelwert	Standard- abweichung
GUS 1xr 163 123-22-21-21-21-21 (2W)	850000	856000	1253000	1105000	1016000	197700
GUS 1xr 163 123-22-21-21-21-21 (5W)	804000	804000	675000	699000	745500	68300
GUS 1xr 163 123-22-21-21-21-21 (8W)	816000	742000	765000	818000	785250	37900
GUS 1xr 163 132-11-21-21-21 (2W)	1098000	1195000	1089000	1090000	1118000	51500
GUS 1xr 163 132-11-21-21-21 (5W)	783000	721000	1160000	1160000	956000	236900
GUS 1xr 163 132-11-21-21-21 (8W)	1071000	1043000	788000	746000	912000	168700
GUS 1xr 163 135-12-21-21 (2W)	1070000	1295000	983000	1116000	1116000	131500
GUS 1xr 163 135-12-21-21 (5W)	737000	837000	877000	932000	845750	82300
GUS 1xr 163 135-12-21-21 (8W)	1060000	1130000	1096000	1092000	1094500	28600
GUS 1xr 163 138-22-23-21-21 (2W)	1022000	910000	991000	1147000	1017500	98400
GUS 1xr 163 138-22-23-21-21 (5W)	693000	589000	547000	538000	591750	71100
GUS 1xr 163 138-22-23-21-21 (8W)	689000	716000	693000	715000	703250	14200
GUS 1xr 163 139-21-21-21-21 (2W)	1151000	1225000	915000	927000	1054500	157200
GUS 1xr 163 139-21-21-21-21 (5W)	715000	640000	538000	484000	594250	103300
GUS 1xr 163 139-21-21-21-21 (8W)	512000	649000	518000	659000	584500	80400

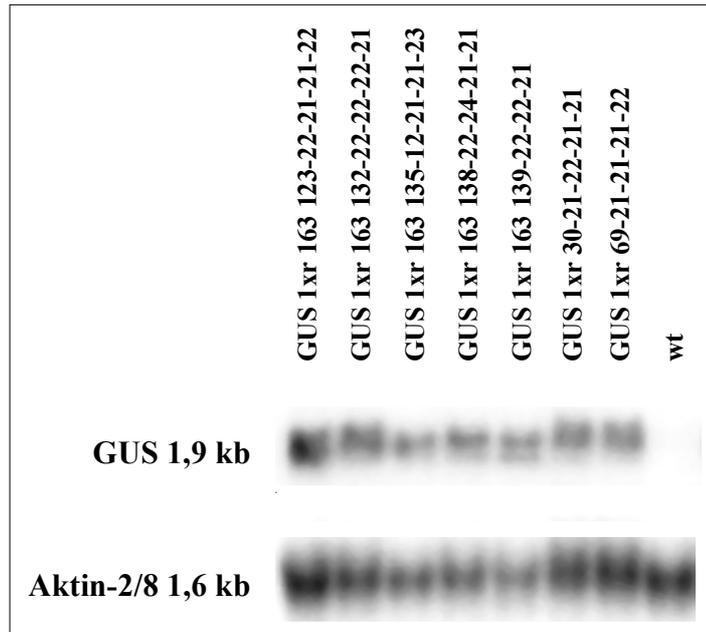
Tabelle 3.11 Ergebnisse der quantitativen β -Glucuronidase-Aktivitätstests homozygoter *A. thaliana* Linien, die das T-DNA Konstrukt GUS 1xr 163 beinhalten

Die Angaben der Aktivitätsmessungen sind in pmol 4-MU/ min/ mg Protein angegeben. Zwei, fünf und acht Wochen alte Pflanzen wurden getestet (2W, 5W und 8W). Die Aktivitätswerte wurden gerundet.

Das Expressionsniveau des GUS-Reportergens von Pflanzen mit der GUS 1xr 163 T-DNA bzw. der GUS 1xr T-DNA wurden vergleichend analysiert, um zu überprüfen inwieweit die direkte Nähe des repetitiven Elementes 163 zum 35S CaMV Promotor des GUS-Reportergens einen Einfluß auf dessen Expression besitzt. Abbildung 3.9 und 3.10 zeigen die Ergebnisse der GUS-Aktivitätsmessungen und Northern Blot Analysen für fünf *A. thaliana* Transformanten des

Konstruktes GUS 1xr 163 im Vergleich zu zwei *A. thaliana* Transformaten des Konstruktes GUS 1xr. Die vergleichbar hohe Expression in den untersuchten transgenen Linien zeigt, daß die Präsenz des repetitiven Elementes 163 in der T-DNA der Pflanzen keinen Einfluß auf die Expression des Transgens hat. Vergleichbare Ergebnisse wurden für Pflanzenlinien mit den T-DNAs GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA bzw. GUS 1xr 164 erhalten (Tabelle 3.12 und Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.9 Northern Blot Analyse zum Vergleich der für die T-DNAs GUS 1xr 163 und GUS 1xr homozygoten Linien
 Zur RNA-Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde erst mit einer GUS und anschließend mit einer Actin 2 und 8 Sonde (An *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde Wildtyp RNA verwendet. Die Ausschnitte zeigen Ergebnisse der jeweiligen Hybridisierungen.



Für die Pflanzen, die das T-DNA Konstrukt GUS 1xr 163 tragen (vergl. Tabelle 3.12 und Abb. 3.9 bzw. 3.10) wurde der Mittelwert der GUS-Aktivität für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen ermittelt. Die jeweiligen Mittelwerte der GUS-Aktivitäten der Pflanzen, deren T-DNAs die Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 164 und GUS 1xr enthalten, wurden ebenfalls gebildet (vergl. Tabelle 3.12). Dadurch ist der Vergleich zwischen transgenen Pflanzen, deren T-DNAs neben dem β -Glucuronidasegen unterschiedliche repetitive Elemente beinhalten, gegeben. Die größten Abweichungen bestehen mit einem Faktor 1,3 für 5 Wochen alte Pflanzen zwischen den Mittelwerten der T-DNA Pflanzenlinien GUS 1xr pAL und den T-DNA Linien GUS 1xr 501. Ein Unterschied der GUS-Aktivität zwischen den Pflanzenlinien der homozygoten T-DNAs GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163, GUS 1xr 164 und GUS 1xr besteht damit nicht. Dies deutet darauf hin, daß die transgenen Pflanzen unabhängig von den verwendeten repetitiven Elementen eine einheitlich hohe Expression besitzen. Der ermittelte Gesamtmittelwert der transgenen Pflanzen, deren T-DNAs GUS 1xr *repeat* Konstrukte beinhalten, zeigt im Vergleich zum Mittelwert der Linien, deren T-DNA das Konstrukt GUS 1xr trägt, ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Die

repetitiven Elemente besitzen folglich keinen Einfluß auf die Expression des 3SS CaMV GUS Reportergens.

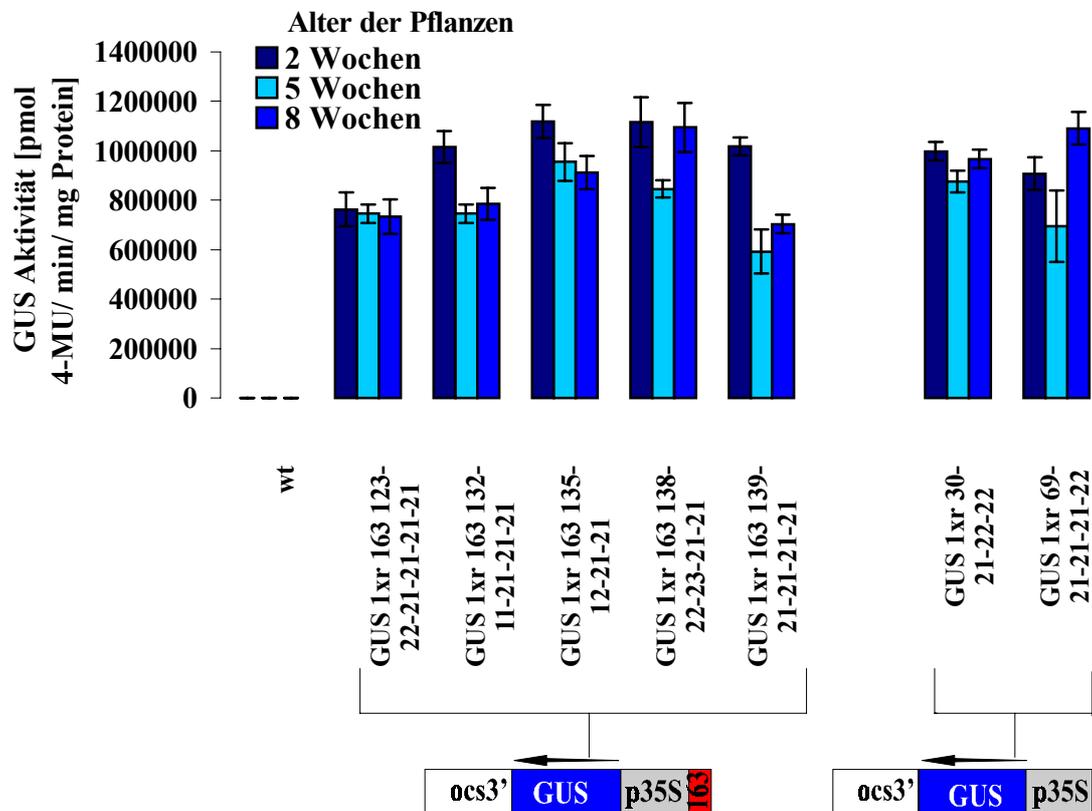


Abb. 3. 10 Vergleich der β -Glucuronidase-Aktivität von für die T-DNAs GUS 1xr 163 und GUS 1xr homozygoten Pflanzen
 Jeweils zwei Extrakte wurden aus jungen Rosettenblättern von 5 bis 10 unterschiedlichen Pflanzen pro Linie erstellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Pflanzenlinien	Mittelwerte			Standardabweichungen		
	2 Wochen	5 Wochen	8 Wochen	2 Wochen	5 Wochen	8 Wochen
GUS 1xr pAL 27-1-21-21-21-21-21	1112000	403000	476000	144000	38000	69000
GUS 1xr pAL 42-1-21-21-21	938000	446000	660000	36000	38000	65000
GUS 1xr pAL 101-23-21-21-21-21	1125000	619000	809000	154000	76000	67000
GUS 1xr pAL 103-13-21-21-21	1083000	631000	636000	144000	36000	100000
GUS 1xr pAL 126-21-21-21	1259000	644000	717000	107000	89000	37000
Mittelwert GUS 1xr pAL	1103400	548600	659600	117000	55400	67600
GUS 1xr 501 107-21-23-21-21	1124000	807000	811000	116000	74000	129000
GUS 1xr 501 116-21-21-21-21	1063000	675000	756000	71000	115000	120000
GUS 1xr 501 128-21-21	1083000	665000	740000	65000	62000	65000
Mittelwert GUS 1xr 501	1090000	716000	769000	84000	84000	105000
GUS 1xr 502 111-21-21-21-21-21	850000	552000	653000	61000	67000	138000
GUS 1xr 502 119-24	802000	587000	884000	27000	88000	108000
GUS 1xr 502 122-21-21-21	1017000	663000	697000	106000	19000	142000
GUS 1xr 502 148-21	1186000	813000	1062000	131000	38000	93000
GUS 1xr 502 153-23-21	1045000	770000	812000	165000	145000	89000
Mittelwert GUS 1xr 502	980000	677000	821600	98000	71400	114000
GUS 1xr rDNA 24-21-21-21	893000	773000	846000	40000	40000	56000
GUS 1xr rDNA 104-24-22-21	741000	495000	893000	53000	128000	93000
GUS 1xr rDNA 117-21-21-21	779000	622000	693000	69000	48000	23000
GUS 1xr rDNA 125-22-21-21-21	853000	461000	715000	292000	27000	101000
GUS 1xr rDNA 128-21-21-21	1497000	759000	885000	21000	9000	51000
Mittelwert GUS 1xr rDNA	952600	622000	806400	95000	50400	64800
GUS 1xr 163 123-22-21-21-21-21	762000	745000	734000	198000	68000	38000
GUS 1xr 163 132-11-21-21-21	1016000	746000	785000	51000	230000	169000
GUS 1xr 163 135-12-21-21	1118000	954000	912000	131000	82000	29000
GUS 1xr 163 138-22-23-21-21	1116000	846000	1095000	98000	71000	14000
GUS 1xr 163 139-21-21-21-21	1018000	592000	704000	157000	103000	80000
Mittelwert GUS 1xr 163	1006000	776600	846000	127000	110800	66000
GUS 1xr 164-102-21-21-21-21-21	1054000	594000	584000	32000	73000	88000
GUS 1xr 164 113-11-21-21-21-21-21	936000	490000	903000	72000	69000	158000
GUS 1xr 164 129-11-21-21-21	1469000	451000	904000	65000	44000	81000
Mittelwert GUS 1xr 164	1153000	512000	797000	57000	62000	109000
Gesamtmittelwert GUS 1x repeat	1025000	643000	779000	184000	145000	151000
GUS 1xr 18-21-24-21-21	803000	572000	605000	46000	114000	105000
GUS 1xr 30-21-22-22	998000	876000	967000	22000	43000	37000
GUS 1xr 69-21-21-21-22	907000	696000	1091000	23000	14000	65000
Mittelwert GUS 1xr	903000	715000	888000	30000	57000	69000

Tabelle 3.12: Vergleich der quantitativen β -Glucuronidase Aktivitätswerte für Pflanzenlinien, die die GUS1x repeat bzw. GUS 1xr T-DNAs beinhalten

Die Angaben der Aktivitätsmessungen sind in pmol 4-MU/min/mg Protein dargestellt. Die Aktivitätswerte wurden gerundet. Die Mittelwerte der Pflanzenlinien mit identischen T-DNAs und die Gesamtmittelwerte der Pflanzenlinien, deren T-DNAs repetitive Elemente enthalten, sind hervorgehoben.

3.3.1.3 β -Glucuronidase Expressionsanalysen der für die T-DNA hemizygoten Pflanzenlinien der Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163 und GUS 1xr 164

Die Analyse der β -Glucuronidase Aktivitäten der für die T-DNA GUS 1xr *repeat* hemizygoten Pflanzen im Vergleich zu homozygoten Pflanzen sollte Aufschluß darüber geben, ob die Verminderung der Anzahl der Reportergenkopien mit einer Verminderung der GUS-Aktivität einhergeht. In Abbildung 3.11 und 3.12 sind GUS-Expressionswerte der für die GUS 1xr 163 T-DNA homozygoten Pflanzen denen hemizygoter Pflanzen gegenübergestellt. Zum Vergleich sind die GUS-Aktivitäten homo- und hemizygoter Pflanzen, die die T-DNA GUS 1xr tragen, angegeben.

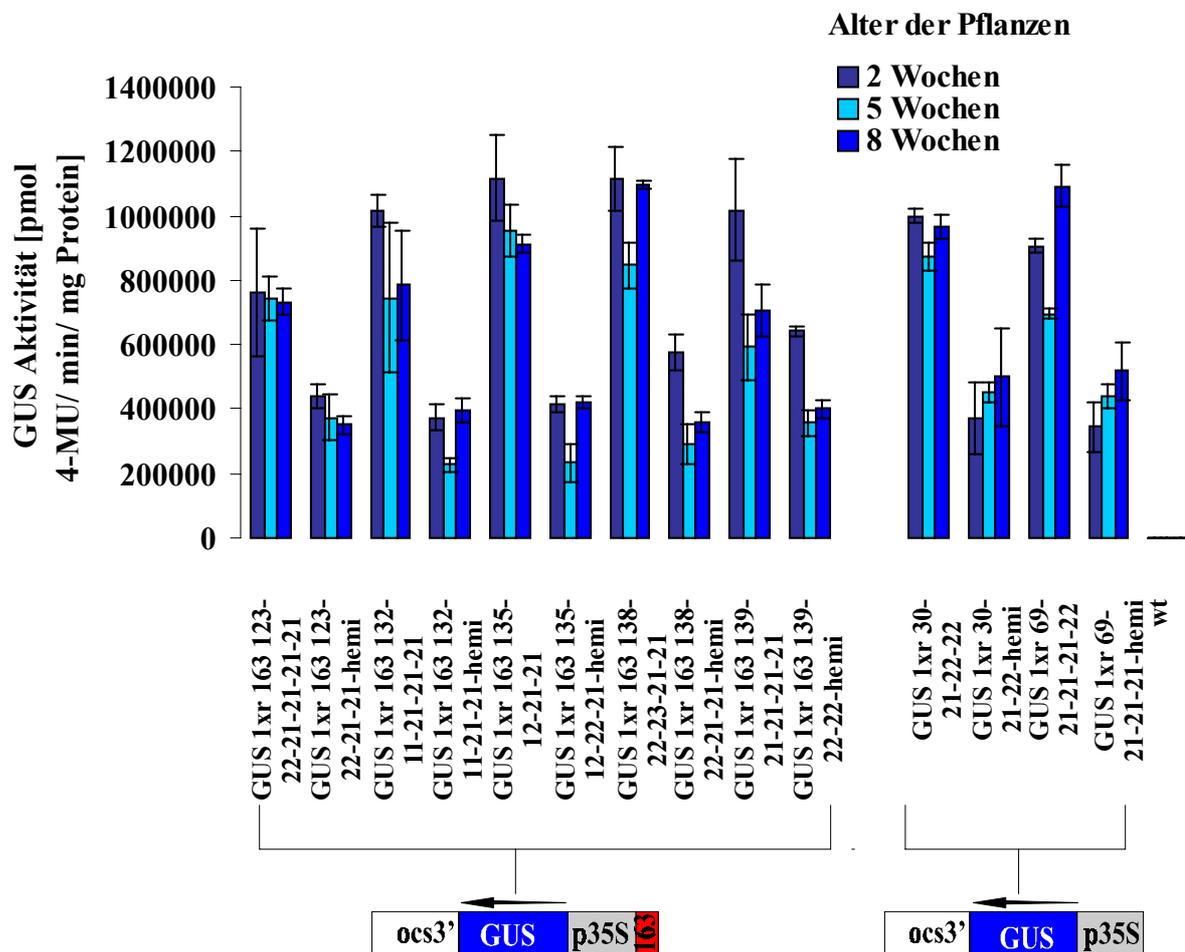


Abb. 3.11: Vergleich der GUS-Aktivitäten der für die T-DNAs GUS 1xr 163 und GUS 1xr homozygoten Pflanzen mit der hemizygoter Pflanzen

Die Meßwerte wurden nach 2, 5 und 8 Wochen ermittelt. Die für die T-DNA hemizygoten Linien sind mit dem Zusatz hemi gekennzeichnet. Die Standardabweichungen, die sich aus den Messungen zweier Proteinextrakte ergeben, sind als Fehlerbalken angegeben. Die Extrakte wurde aus jungen Rosettenblättern von ca. 5-10 Pflanzen der jeweiligen Linie hergestellt.

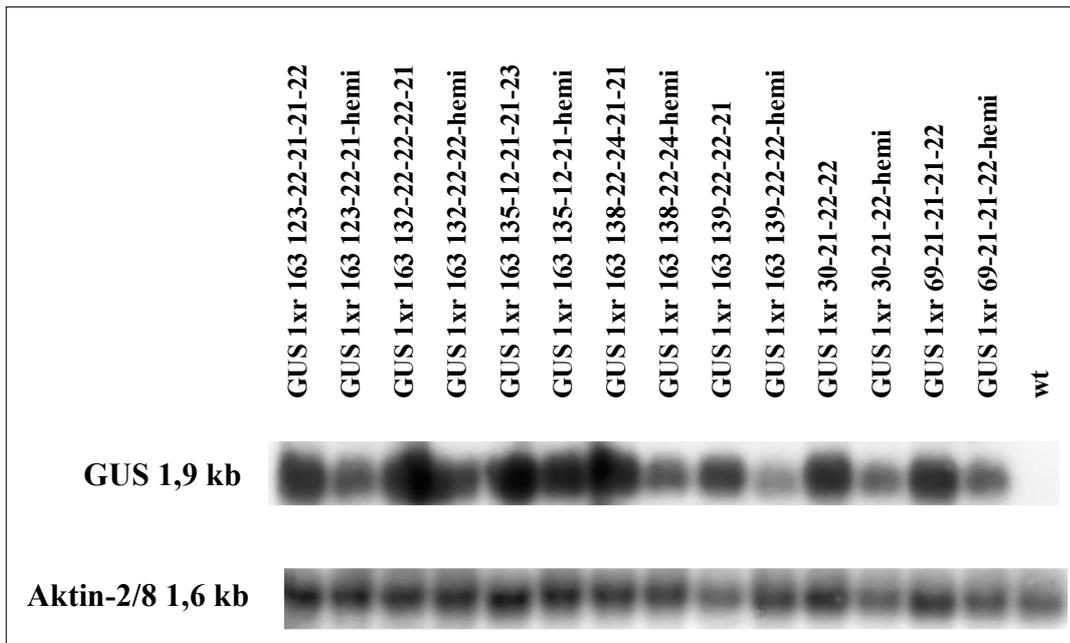


Abb. 3.12: Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der für die T-DNA homozygoten Linien GUS 1xr 163 und GUS 1xr sowie der entsprechenden hemizygoten Pflanzen

Zur RNA-Präparation wurden junge Rosettenblätter 8 Wochen alter transgener *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die für die T-DNA hemizygoten Linien sind mit dem Zusatz hemi gekennzeichnet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS und anschließend mit einer Aktin-2/8 Sonde (An *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde Wildtyp RNA verwendet. Die Ausschnitte zeigen Ergebnisse der jeweiligen Hybridisierungen.

Wie zu erkennen ist, weisen die für die GUS 1xr 163 T-DNA hemizygoten Pflanzen ebenfalls eine einheitliche GUS-Aktivität bzw. mRNA Konzentration auf, die im Vergleich zur GUS-Aktivität und Expression der homozygoten T-DNA Linien verringert ist. Die Reduktion der Zahl der GUS-Reportergenkassetten von zwei auf eine, führt vergleichbar zu GUS 1xr T-DNA Pflanzen in allen GUS 1xr 163 T-DNA Pflanzen zu einer Verminderung der β -Glucuronidase Aktivität und der mRNA Konzentration. Vergleichbare Ergebnisse wurden anhand der GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA und GUS 1xr 164 T-DNA Pflanzenlinien erhalten (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.13 enthält die GUS-Aktivitätswerte für die T-DNA GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163 und GUS 1xr 164 hemizygoten Pflanzen. Zwei, fünf und acht Wochen alte Pflanzen wurden untersucht. Die Gegenüberstellung der Gesamtmittelwerte der GUS-Aktivitäten der für die T-DNA GUS 1xr *repeat* homozygoten Pflanzen (vergl. Tabelle 3.12) denen hemizygoter Pflanzen (vergl. Tabelle 3.13) ergibt einen durchschnittlichen Quotienten von 2,0 (2 Wochen alte Pflanzen), 1,7 (5 Wochen alte Pflanzen) und 2,0 (8 Wochen alte Pflanzen). Dies zeigt, daß jede Reportergenkassette gleich viel zur Expression in der Pflanze beiträgt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der GUS 1x Linien (M. Gils, 2000).

Pflanzenlinien	Mittelwerte			Standardabweichungen		
	2 Wochen	5 Wochen	8 Wochen	2 Wochen	5 Wochen	8 Wochen
GUS 1xr pAL 27-1-21-21-21-hemi	456000	206000	288000	61000	20000	23000
GUS 1xr pAL 42-1-21-hemi	60000	307000	301000	72000	57000	29000
GUS 1xr pAL 101-23-21-21-hemi	610000	307000	312000	119000	47000	42000
GUS 1xr pAL 103-13-21-21-hemi	670000	332000	390000	3000	64000	31000
GUS 1xr pAL 126-11-22-hemi	636000	392000	372000	142000	67000	21000
Mittelwert GUS 1xr pAL hemi	486400	308800	332600	79400	51000	29200
GUS 1xr 501 107-21-22-hemi	598000	547000	412000	175000	48000	51000
GUS 1xr 501 116-25-hemi	646000	492000	522000	4000	40000	79000
GUS 1xr 501 128-21-hemi	584000	517000	497000	130000	28000	64000
Mittelwert GUS 1xr 501 hemi	610000	519000	477000	103000	39000	65000
GUS 1xr 502 111-21-22-hemi	508000	406000	535000	113000	22000	53000
GUS 1xr 502 119-24-21-hemi	334000	351000	297000	34000	9000	65000
GUS 1xr 502 122-21-21-hemi	521000	526000	357000	53000	34000	50000
GUS 1xr 502 148-21-hemi	420000	361000	418000	52000	14000	28000
GUS 1xr 502 153-22-hemi	541000	406000	379000	58000	28000	42000
Mittelwert GUS 1xr 502 hemi	464800	410000	397200	62000	21400	47600
GUS 1xr rDNA 24-21-21-hemi	438000	360000	400000	97000	85000	35000
GUS 1xr rDNA 104-24-21-hemi	454000	423000	403000	87000	49000	58000
GUS 1xr rDNA 117-21-21-hemi	363000	340000	377000	56000	9000	17000
GUS 1xr rDNA 125-25-hemi	662000	508000	414000	100000	139000	16000
GUS 1xr rDNA 128-21-21-hemi	382000	366000	370000	42000	26000	47000
Mittelwert GUS 1xr rDNA hemi	459800	399400	392800	76400	61600	34600
GUS 1xr 163 123-22-21-21-hemi	438000	373000	351000	36000	71000	30000
GUS 1xr 163 132-11-21-21-hemi	372000	229000	399000	40000	21000	36000
GUS 1xr 163 135-12-22-21-hemi	415000	234000	421000	23000	58000	19000
GUS 1xr 163 138-22-21-21-hemi	576000	290000	358000	56000	62000	36000
GUS 1xr 163 139-22-22-hemi	642000	356000	402000	16000	40000	27000
Mittelwert GUS 1xr 163 hemi	488600	296400	386200	34200	50400	29600
GUS 1xr 164 102-21-21-21-hemi	476000	296000	343000	70000	30000	42000
GUS 1xr 164 113-11-21-21-21-hemi	514000	314000	392000	79000	31000	9000
GUS 1xr 164 129-11-21-21-hemi	550000	365000	378000	61000	30000	81000
Mittelwert GUS 1xr 164 hemi	513000	325000	371000	70000	30333	44000
Gesamtmittelwert GUS 1x repeat hemi	517000	372000	390000	73000	45000	41000
GUS 1xr 30-21-22-hemi	370000	454000	499000	112000	30000	151000
GUS 1xr 69-21-21-22-hemi	345000	439000	518000	77000	39000	87000
Mittelwert GUS 1xr hemi	357500	446500	508500	94500	34500	119000

Tabelle 3.13: Vergleich der quantitativen GUS-Aktivitätsmessungen der für die T-DNA hemizygoten Pflanzen der Konstrukte GUS 1xr pAL, GUS 1xr 501, GUS 1xr 502, GUS 1xr rDNA, GUS 1xr 163, GUS 1xr 164 und GUS 1xr

Die Angaben der Aktivitätsmessungen sind in pmol 4-MU/min/mg Protein dargestellt. Die Aktivitätswerte wurden gerundet. Die Mittelwerte der T-DNA Pflanzenlinien eines jeweiligen T-DNA Konstruktes sind hervorgehoben.

3.3.1.4 Quantitative β -Glucuronidase Aktivitätstests von F1 Nachkommen der Kreuzungen verschiedener homozygoter GUS 1xr *repeat* T-DNA Pflanzenlinien

Zur Analyse einer möglichen Beeinflussung der repetitiven Elemente untereinander und eine dadurch hervorgerufene mögliche Expressionveränderung des β -Glucuronidase Reportergens, wurden verschiedene Kreuzungen homozygoter Transformanten durchgeführt:

- I Kreuzungen zweier Pflanzenlinien, deren T-DNA neben dem 35S-CaMV Promotor des Reportergens β -Glucuronidase das repetitive Element pAL, 500 (in ein- oder zweifacher Kopie) oder rDNA enthält. Die repetitiven DNA Elemente pAL, 500 und rDNA liegen im *A. thaliana* Genom in tandem organisiert vor.
- II Kreuzungen zweier Pflanzenlinien, deren T-DNA neben dem 35S-CaMV Promotor des Reportergens β -Glucuronidase das repetitive Element 163 oder 164 enthält. Die repetitiven DNA Elemente 163 und 164 liegen im *A. thaliana* Genom verteilt in den Centromerregionen vor.
- III Kreuzungen einer Pflanzenlinie, deren T-DNA neben dem 35S-CaMV Promotor des Reportergens β -Glucuronidase das repetitive Element pAL, 500 (in ein- oder zweifacher Kopie) oder rDNA enthält, mit einer Pflanzenlinie, deren T-DNA neben dem 35S-CaMV Promotor des GUS-Gens das repetitive Element 163 oder 164 enthält.
- IV Kreuzungen einer GUS 1xr Pflanzenlinie mit einer Pflanzenlinie, deren T-DNA neben dem GUS Gen das repetitive Element pAL, 500 oder rDNA enthält.
- V Kreuzungen einer GUS 1xr T-DNA Pflanzenlinie mit einer Pflanzenlinie, deren T-DNA neben dem GUS Gen das repetitive Element 163 oder 164 enthält.

Den Kreuzungen I bis V liegen die Ergebnisse der Kreuzungen homozygoter GUS 1x T-DNA Linien zugrunde. Die F1 Nachkommen der Kreuzung zwischen zwei homozygoten GUS 1x T-DNA Pflanzenlinien zeigten eine einheitlich hohe GUS-Aktivität. Diese ist vergleichbar zu der homozygoter GUS 1x Transformanten (D. Schubert, unveröffentlicht).

Für die Kreuzungen I bis V wurden jeweils 2 bis 3 unterschiedliche T-DNA Pflanzenlinien als Pollenakzeptor bzw. Pollendonator verwendet. In Abbildung 3.13 sind exemplarisch die Ergebnisse einiger Kreuzungen (I bis V) dargestellt. Die F1 Nachkommen besitzen im Vergleich zu für die T-DNA homozygoten Pflanzenlinien GUS 1xr 69, GUS 1xr pAL 27 und GUS 1xr 163 135 gleich hohe GUS-Aktivitäten. Das β -Glucuronidase Gen liegt in den F1 Nachkommen der Kreuzungen, sowie in den für die T-DNA homozygoten Pflanzenlinien GUS 1xr, GUS 1xr *repeat* in zweifacher Kopienzahl vor. Auch in diesem Experiment ist ein Einfluß der repetitiven Elemente auf die Transgenexpression nicht nachzuweisen.

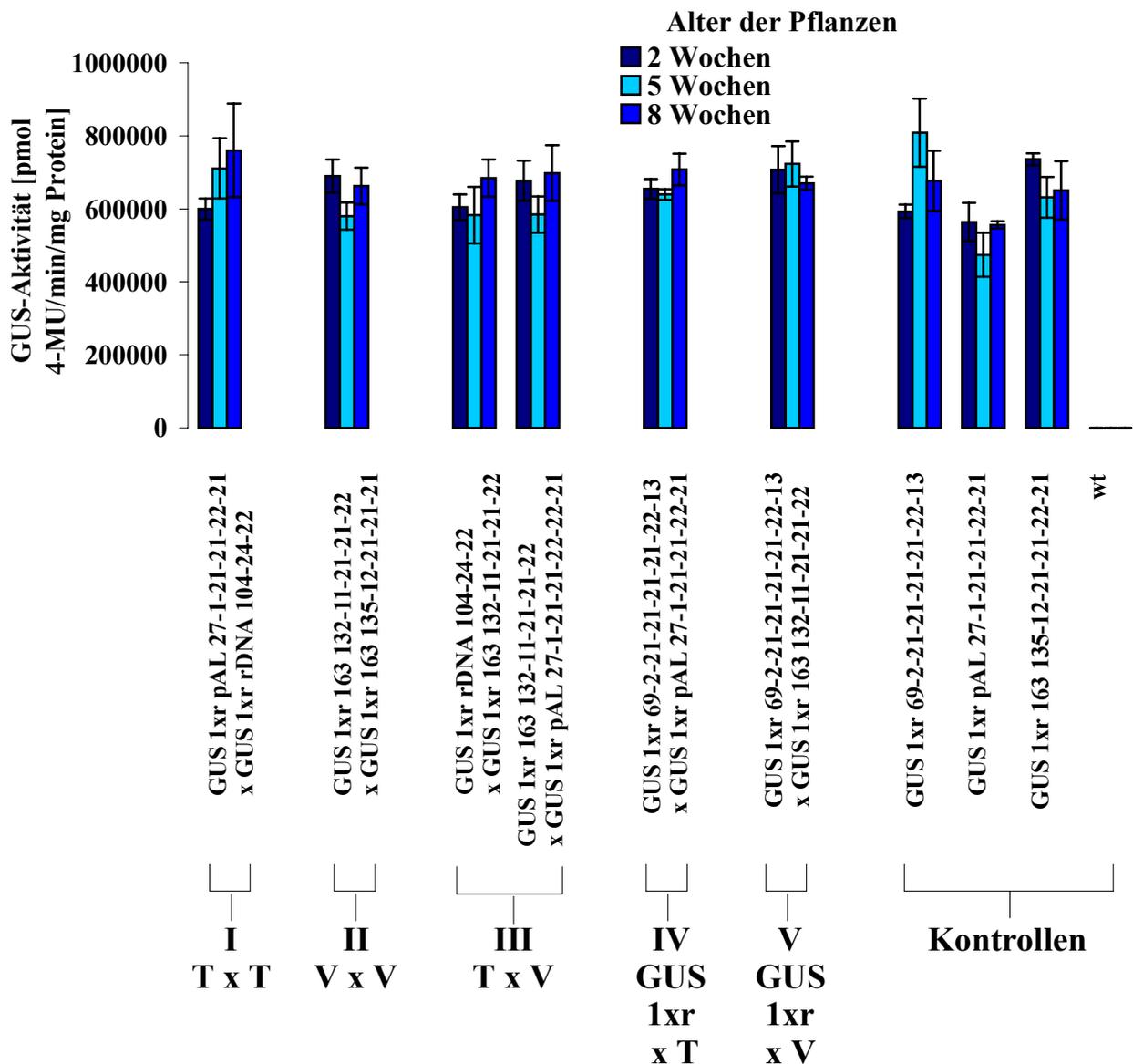


Abb. 3.13

Vergleich der GUS-Aktivitäten der F1 Nachkommen der Kreuzungen I bis V und der für die T-DNA GUS 1xr 69, GUS 1xr pAL 27 und GUS 1xr 163 135 homozygoten Pflanzenlinien.

Dargestellt sind die Meßwerte, die mit Blattmaterial von 2, 5 und 8 Wochen alten transgenen Pflanzen erhalten wurden. Das Blattmaterial der Extrakte wurde von 5-10 Pflanzen entnommen. Die Standardabweichungen werden durch den Fehlerbalken angegeben.

Die Kreuzungen sind durch die Nummerierung I bis V (vergl. Text) und die Bezeichnung der jeweiligen Transformanten angegeben. Die Bezeichnung T (= tandem) und V (= verteilt in der Cenomerregion) beziehen sich auf die Verteilung der jeweiligen repetitiven Elemente im *A. thaliana* Genom.

Die erstgenannten Pflanzenlinien dienen in der Kreuzung als Pollenakzeptor und die zweitgenannten als Pollenspender.

3.3.1.5 β -Glucuronidase Aktivitätstests der T-DNA Pflanzenlinie GUS 1xr rDNA 101

Quantitative GUS-Aktivitätsmessungen homozygoter Pflanzen der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 ergaben stark voneinander abweichende Meßwerte zweier Proteinextrakte (Daten nicht gezeigt). Dies traf für 2, 5 und 8 Wochen alte transgene Pflanzen zu. Semiquantitative GUS-Aktivitätstests zeigten starke Variationen innerhalb der isogenetischen Nachkommenschaft (vergl. Abb. 3.14). Es wurden hochexprimierende und andererseits niedrigexprimierende GUS 1xr rDNA 101 T-DNA Pflanzen beobachtet. Quantitative Aktivitätstests (vergl. Abb. 3.15) einzelner homozygoter GUS 1xr rDNA 101 T-DNA Pflanzen verdeutlichen die, durch semiquantitative Aktivitätstests ermittelten, stark voneinander abweichenden GUS-Aktivitäten. Bereits die zwei Wochen alten transgenen Pflanzen 1, 3, 4 und 5 eine niedrige GUS-Aktivität und wiesen im Verlauf ihrer Entwicklung eine weitere Verringerung auf. Die transgene Einzelpflanze 2 bleibt in ihrer Aktivität stabil hoch und vergleichbar zu für die T-DNA homozygoten GUS 1x Linien. Für die T-DNA hemizygoten GUS 1xr rDNA 101 Pflanzen besitzen eine vergleichbar hohe Aktivität wie GUS 1xr rDNA homozygote Transformanten (vergl. Abb. 3.14 und 3.15). Southern Blot Analysen und iPCR Daten ergaben, daß bei der GUS 1xr rDNA 101 Transformante zwei T-DNAs an einem Locus vorliegen. Die beiden Kopien liegen in invertierter Orientierung zueinander vor. Daher liegen in homozygoten GUS 1xr rDNA 101 T-DNA Pflanzen vier Reportergenkopien vor, während in hemizygoten Pflanzen zwei Kopien vorhanden sind. Vergleichbare Ergebnisse wurden anhand von Pflanzenlinien, die die T-DNA GUS 2x homo- und hemizygot tragen, erhalten (D. Schubert, 1999). Das veränderte Expressionsmuster in der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 ist folglich auf die erhöhte Kopienzahl des GUS-Gens zurückzuführen.

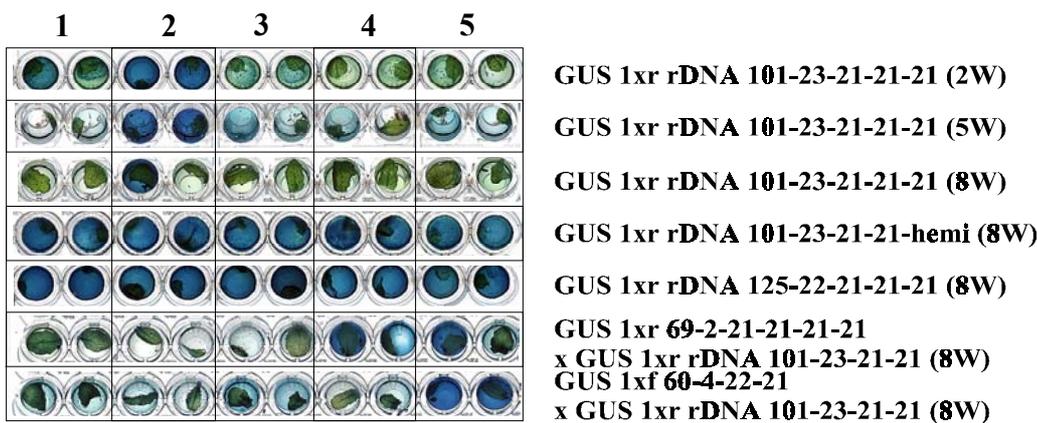


Abb. 3.14 Semiquantitative GUS-Aktivitätstests von für die T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzen der Linie GUS 1xr rDNA 101 und den F1 Nachkommen der Kreuzungen der Linien GUS 1xr rDNA 101 und GUS 1x im Vergleich zur der für die T-DNA homozygote Linie GUS 1xr rDNA 125
 Jeder Linie wurden Stücke von 2 jungen Rosettenblättern abgenommen. Pro Linie wurden 5 Pflanzen (Nr. 1 bis 5) untersucht. Die Blattstücke einer Pflanze sind in einem Kasten zusammengefaßt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

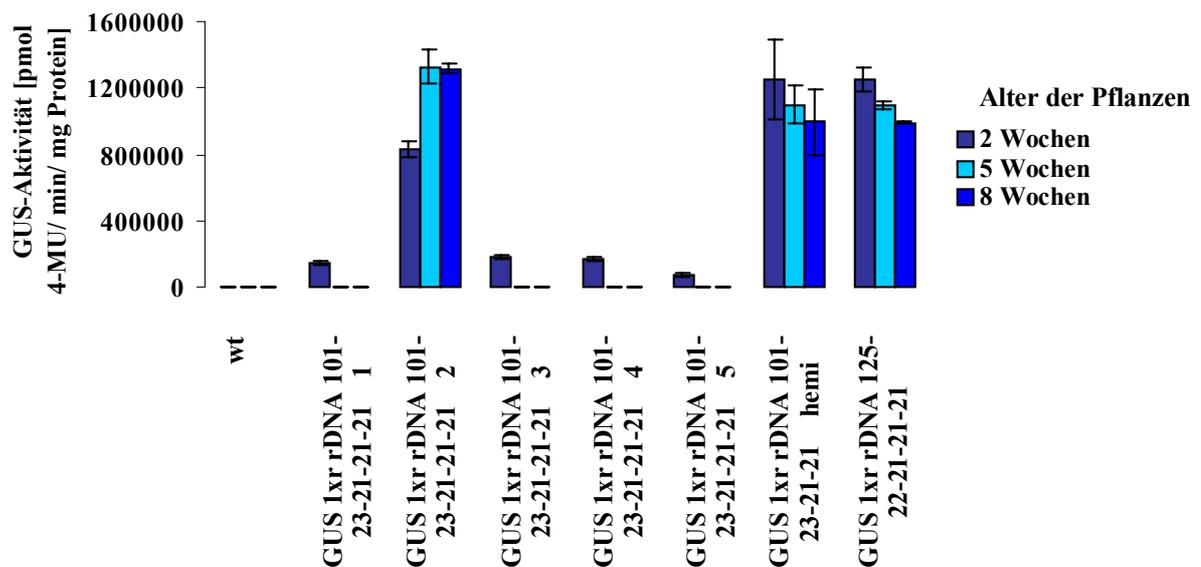


Abb. 3.15: Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität der transgenen Pflanzenlinie GUS 1xr rDNA 101

Im Falle der hemizygoten Pflanzen wurden die Extrakte aus Rosettenblättern von 5-10 Pflanzen hergestellt. Die übrigen Messungen stellen Aktivitätstest einzelner Pflanzen (Nr. 1 bis 5) der homozygoten Linie dar.

Die Messung erfolgte nach 2, 5 und 8 Wochen. Die Übertragung der Pflanzen von axenischer Kultur in Erde erfolgte nach 2 Wochen. Die Standardabweichungen, die sich aus beiden Messungen der Proteinextrakte ergeben, sind als Fehlerbalken angegeben.

Zum Vergleich wurde die für die T-DNA homozygote Linie GUS 1xr rDNA 125 gemessen.

GUS-Aktivitätstests der F1 Nachkommen der Kreuzungen zwischen der homozygoten T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 und den homozygoten T-DNA Linien der Konstrukte GUS 1xr und GUS 1xf sind in Abbildung 3.14 (semiquantitativ) und 3.16 (quantitativ) dargestellt. Die GUS-Aktivität ist bereits nach zwei Wochen vergleichbar zu homozygoten Pflanzen der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101. Variation der GUS-Aktivität in der F1 Nachkommenschaft der o.g. Kreuzungen besteht auch in diesem Fall.

Das β -Glucuronidase Reportergen liegt in der F1 Nachkommenschaft der Kreuzungen in dreifacher Kopie vor, während es in den homozygoten GUS 1xr rDNA 101 T-DNA Linie in vierfacher Kopie vorliegt. Analysen der GUS Aktivität mit drei und sechs Reportergenkopien wurden bereits anhand für die T-DNA GUS 3x hemi- und homozygoten Linien durchgeführt (D. Schubert, 1999 und M. Gils, 2000). Die analysierten F1 Nachkommen der Kreuzungen der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 mit den T-DNA Linien GUS 1xr und GUS 1xf bestätigen, daß in Pflanzen, in denen drei oder mehr Kopien des GUS-Gens vorliegen, Silencing auftritt.

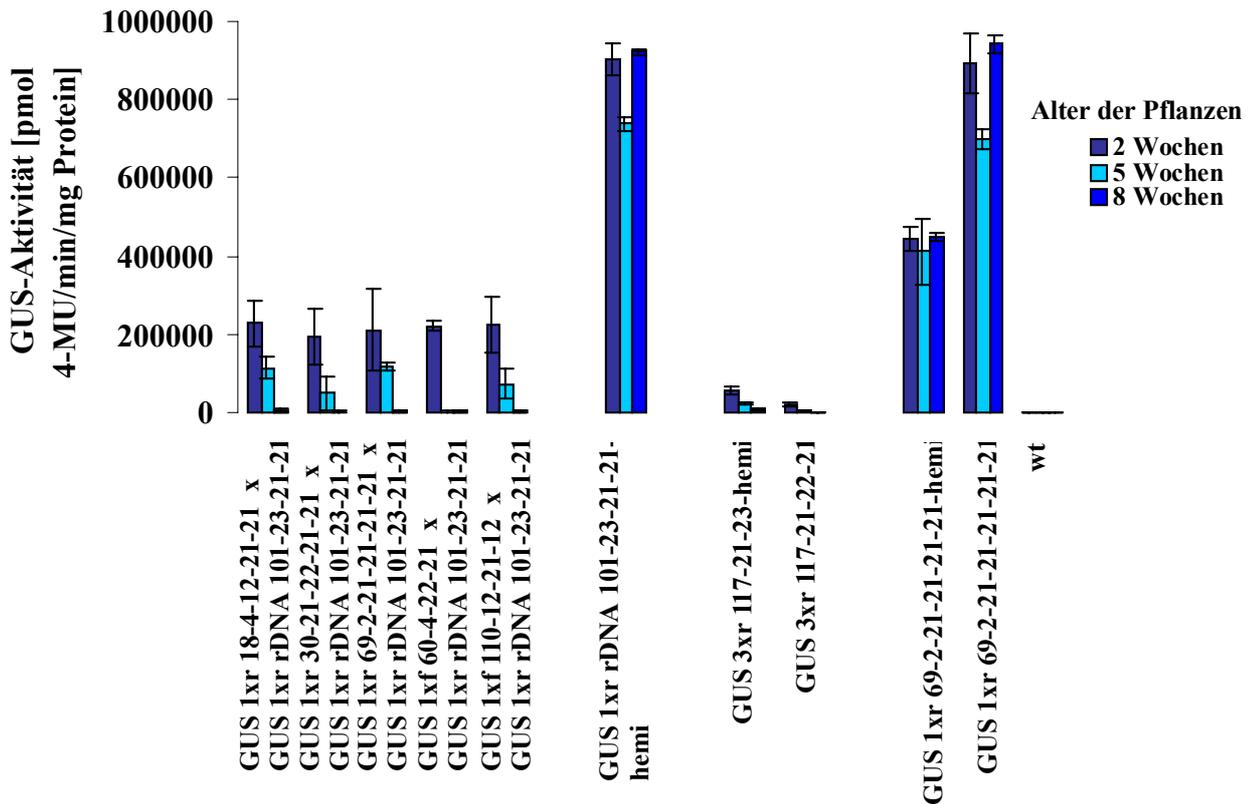


Abb. 3.16: Kreuzungen der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 mit verschiedenen T-DNA Pflanzenlinien der Konstrukte GUS 1xr und GUS 1xf

Es wurde die GUS-Aktivität der F1 Nachkommen der Kreuzungen der GUS 1xr rDNA 101 Transformante und den verschiedenen Transformanten der Konstrukte GUS 1xr und GUS 1xf gemessen. Zur Herstellung der Extrakte wurde Blattmaterial von 5-10 Pflanzen vereint. Die GUS-Aktivität wurde nach 2, 5 und 8 Wochen ermittelt. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angegeben. Die Kontrolle enthält Wildtyppflanzen (wt). Der Vergleich der GUS-Aktivität der F1 Nachkommen der Kreuzungen erfolgte zu homo- und hemizygoten Pflanzen, deren T-DNAs das Konstrukt GUS 3x bzw. GUS 1x tragen.

3.3.1.6 Quantitative β -Glucuronidase-Aktivitätstests von *A. thaliana* Pflanzen, die sowohl ein GUS-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors als auch ein promotorloses GUS-Transgen enthalten

Transgene Linien, die mehr als zwei Kopien des β -Glucuronidase Reportergens aufweisen, zeigten Silencing. Silencing könnte möglicherweise durch DNA-DNA-Wechselwirkung (zusammengefaßt in Selker, 1997, 1999) oder auch durch das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes an mRNA, welcher zum Abbau der Transgen-mRNA führen (Lindbo *et al.*; 1993, Dehio und Schell, 1994; Elmayan *et al.*, 1998; Metzlauff *et al.*, 1997; Que *et al.*, 1997), ausgelöst werden.

Zur Klärung der Frage, ob eine DNA-DNA Homologie zu Silencing führt, wurden Kreuzungen zwischen homozygoten Pflanzen, deren T-DNA ein promotorloses β -Glucuronidase Gen

(Δ GUS) und homozygoten Pflanzen, deren T-DNA ein, zwei oder drei GUS-Reportergenkassetten tragen, durchgeführt. Die F1 Pflanzen enthalten eine, zwei bzw. drei 35S CaMV GUS-Reportergenkassetten und jeweils eine GUS-Reportergenkassette ohne Promotor. Zur vergleichenden Analyse der Reportergenaktivität wurden semiquantitative (Daten nicht gezeigt) und quantitative GUS-Aktivitätstests durchgeführt. Die Werte wurden mit denen verschiedener für die T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzen der Konstrukte GUS 1xr, GUS 2xr bzw. GUS 3xr verglichen. Die Pflanzen, die die Δ GUS T-DNA enthalten, wurden als Pollenakzeptor und die Pflanzen, die die T-DNAs GUS 1xr, GUS 2xr bzw. GUS 3xr enthalten bzw. die T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 wurden als Pollenspender verwendet. Zur Kreuzung wurden jeweils mindestens zwei unterschiedliche Transformanten als Pollenakzeptor bzw. –spender verwendet.

Weiterhin wurden transgene Pflanzenlinien untersucht, deren T-DNA eine β -Glucuronidase Reportergenkassette ohne Promoter sowie eine weitere unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotor enthält (vergl. Abb. 3.1 Δ GUS 2a).

Abbildung 3.17 zeigt exemplarisch die GUS-Aktivitäten für 8 Wochen alte F1 Nachkommen der Kreuzungen der homozygoten T-DNA Pflanzenlinie Δ GUS 113 und den Transformanten der Konstrukte GUS 1xr, GUS 2xr sowie der Linie GUS 1xr rDNA 101. Weiterhin wurden die GUS Aktivitäten der für die T-DNA homozygoten Pflanzenlinien Δ GUS 2a in Abbildung 3.17 dargestellt.

Alle Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Präsenz von promotorlosen GUS-Genen keinen Einfluß auf die Expression eines Transgens unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotor hat. Es besteht kein Unterschied in der GUS-Aktivität zwischen transgenen Pflanzen mit ein bzw. zwei Kopien des 35S CaMV GUS-Gens und transgenen Pflanzen, die zusätzlich zu diesen 35S CaMV GUS-Genkopien noch ein promotorloses GUS-Gen enthalten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Δ GUS 2a Transformanten, die die promotorlosen und CaMV-GUS Gene an einem Locus tragen. Im Vergleich dazu zeigen transgene Pflanzen mit drei 35S CaMV GUS-Genen Silencing.

Vergleichbare Ergebnisse wurden anhand der gemessenen GUS-Aktivitäten der dargestellten transgenen Pflanzen nach 2 und 5 Wochen bzw. anhand der F1 Nachkommen der weiteren Kreuzungen erhalten (Daten nicht gezeigt). Das durch quantitative GUS-Aktivitätsanalysen erhaltene Ergebnis wurde anhand von Northern Blot Analysen bestätigt (vergl. Abb. 3.18 und 3.20).

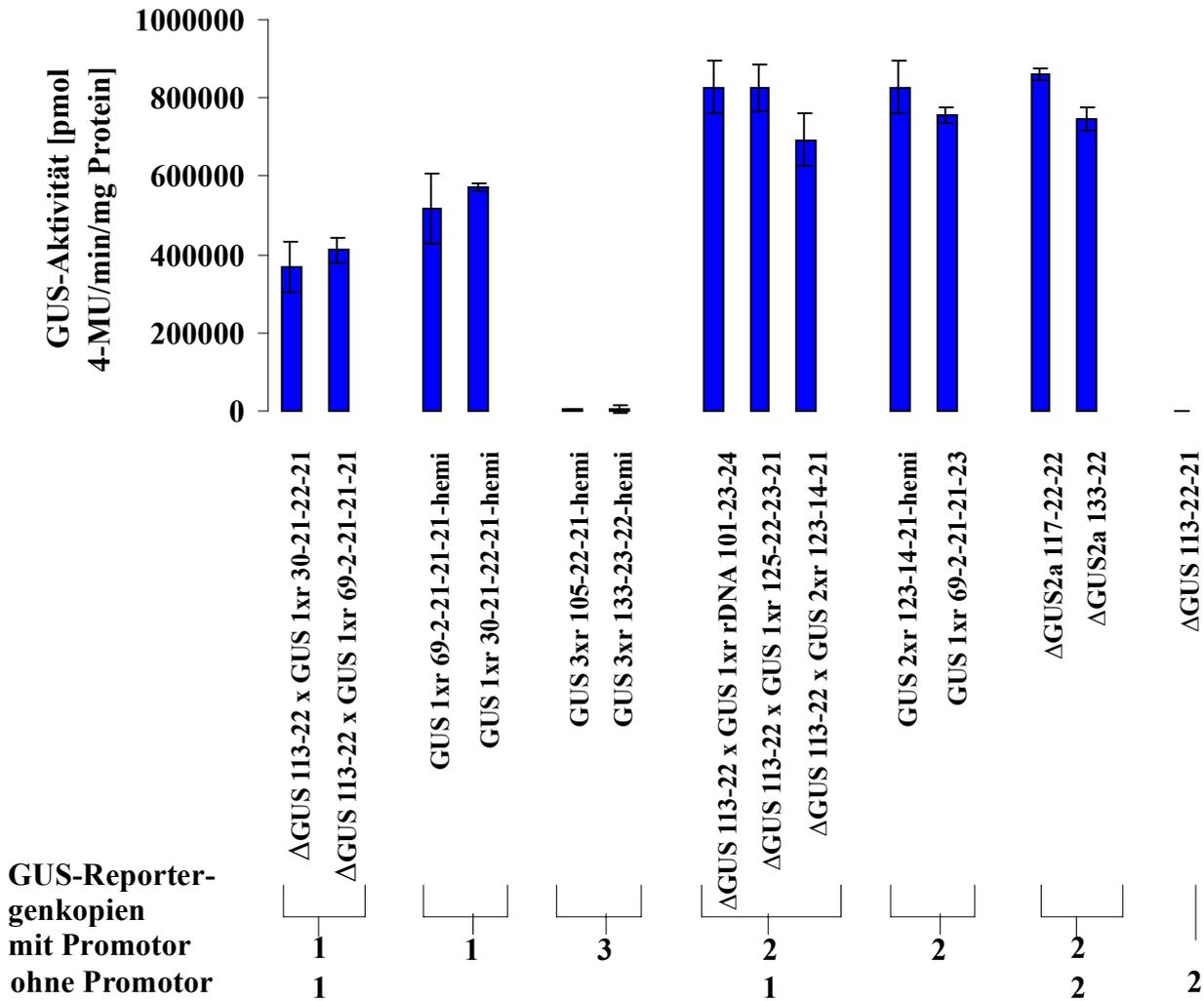


Abb. 3.17 Vergleich der β -Glucuronidase-Aktivität der F1 Nachkommen der Kreuzungen der homozygoten T-DNA Linien Δ GUS und GUS 1xr bzw. GUS 2xr und GUS 1xr rDNA 101 und der homozygoten Δ GUS 2a Transformanten mit homozygoten Pflanzen der GUS 1xr T-DNAs und hemizygoten Pflanzen der GUS 2xr T-DNAs
 Die GUS-Aktivität wurde exemplarisch nach 8 Wochen dargestellt. Zur Herstellung der Proteinextrakte wurde Blattmaterial von 5-10 Pflanzen vereint. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angegeben. Die Anzahlen der GUS Reportergenkopien mit und ohne Promotor sind für die einzelnen Linien angegeben.

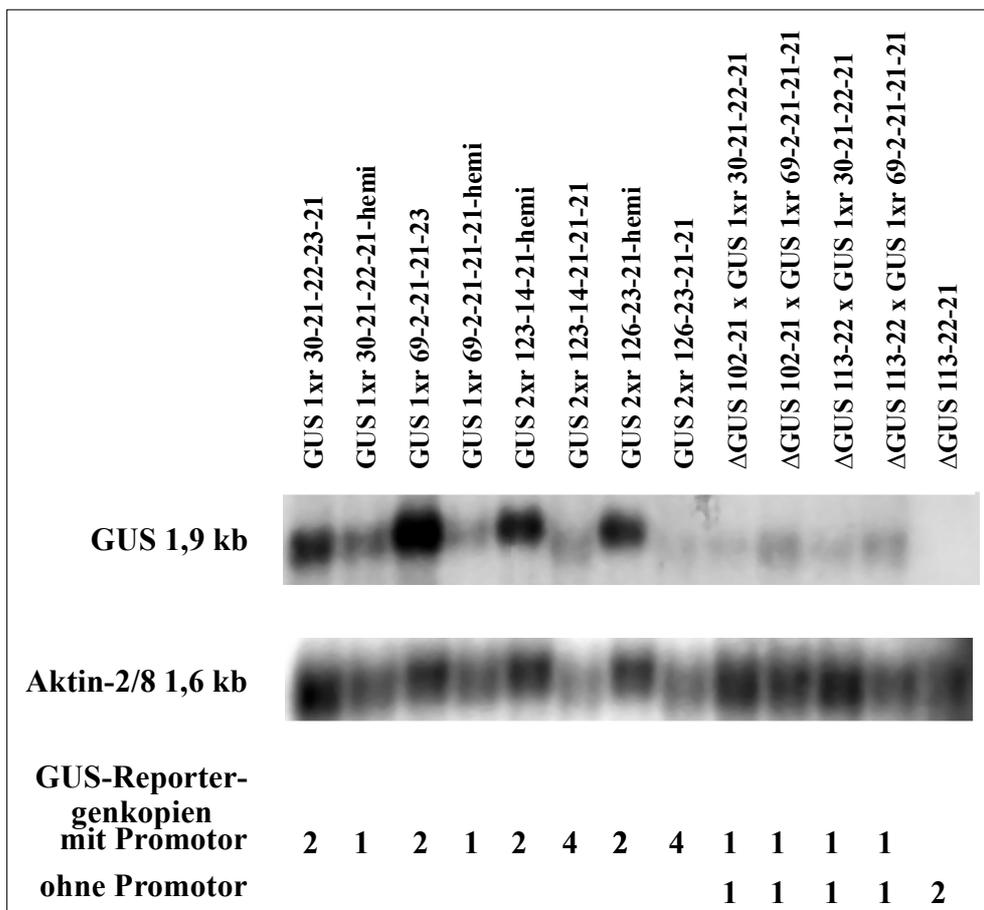


Abb. 3.18 Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der F1 Nachkommen der Kreuzungen der Δ GUS und GUS 1xr T-DNA Linien zu der homo- und hemizygoter GUS 1xr und GUS 2xr Pflanzen

Zur RNA-Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS- und anschließend mit einer Actin-2/8 Sonde (An *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde RNA der T-DNA Linie Δ GUS 113-22-21 verwendet. Die Anzahl der GUS-Reportergenkassetten mit und ohne Promotor sind angegeben. Die Ausschnitte zeigen Ergebnisse der jeweiligen Hybridisierungen.

Ergebnisse der Aktin-Hybridisierung zeigen eine unterschiedliche Beladung des RNA-Gels.

Die Pflanzen der F1 Nachkommenschaft der Kreuzungen der homozygoten T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes Δ GUS mit homozygoten T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes GUS 3xr enthalten drei Kopien des CaMV 35S β -Glucuronidasegens und eine Kopie des GUS-Gens ohne Promotor. In Abbildung 3.18 sind exemplarisch die quantitativen GUS-Aktivitäten der F1 Kreuzungsnachkommen im Vergleich zu für die T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzen des Konstruktes GUS 3xr dargestellt. Es wird deutlich, daß die F1 Nachkommen der Kreuzungen ein vergleichbar hohes Aktivitätsniveau wie die GUS 3xr hemizygoten Pflanzenlinien besitzen. Dieses Ergebnis wurde auch in Northern Blot Analysen erhalten (vergl. Abb. 3.20). Die Variabilität, die zwischen einzelnen homo- und hemizygoten GUS 3xr Pflanzen einer Transformante besteht, spiegelt sich ebenfalls in den F1 Kreuzungsnachkommen wieder. Diese konnte anhand semiquantitativer (Daten nicht gezeigt) und quantitativer GUS-Analysen

(vergl. Abb. 3.19, hohe Standardabweichung aufgrund stark abweichender Aktivitätsmeßwerte) ermittelt werden.

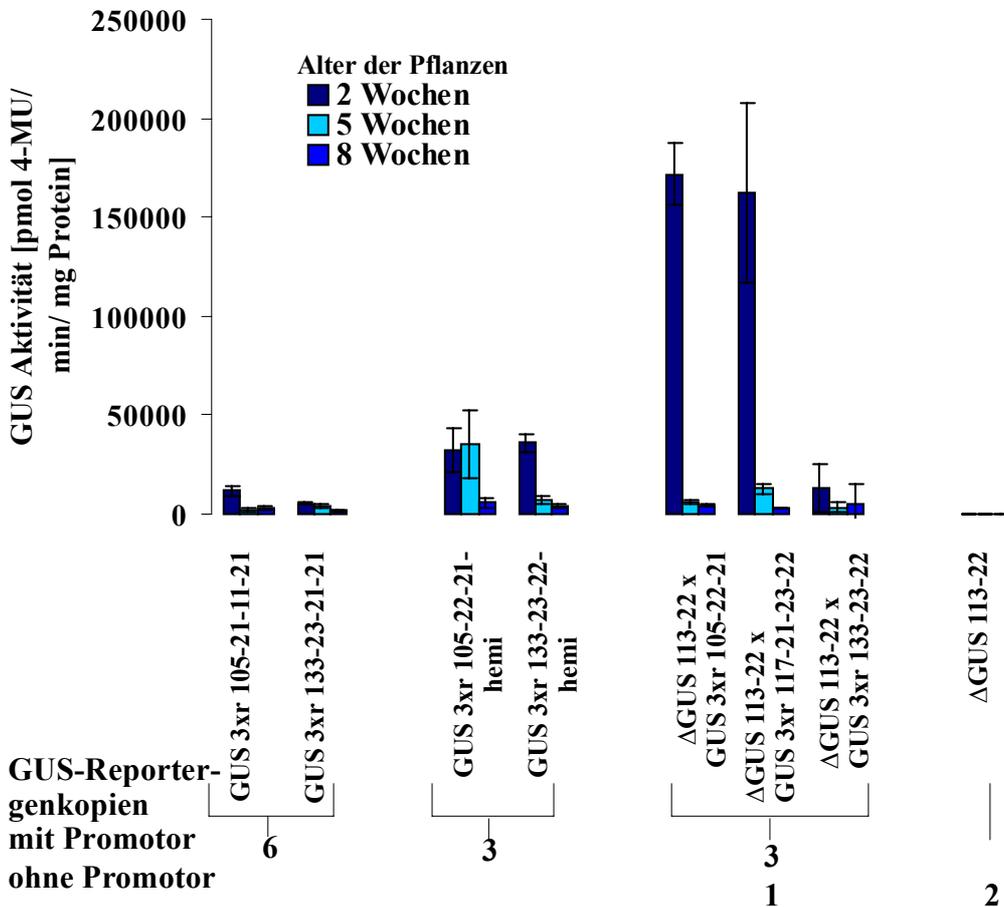


Abb. 3.19 Vergleich der GUS-Aktivitäten der für die T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzenlinien des Konstruktes GUS 3xr und der F1 Nachkommen der Kreuzung der T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes ΔGUS und der T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes GUS 3xr
 Zur Herstellung der Extrakte wurde Blattmaterial von 5-10 Pflanzen vereint. Dargestellt sind die Meßwerte für 2, 5 und 8 Wochen alten Pflanzen. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angegeben. Als Kontrolle wurde die Pflanzenlinie ΔGUS 113 verwendet. Zum Vergleich wurden homo- und hemizygoter Pflanzenlinien, deren T-DNA das Konstrukt GUS 3xr trägt, analysiert.

Anhand der erhaltenen GUS-Aktivität der F1 Nachkommenschaft der Kreuzungen der homozygoten T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes ΔGUS und den homozygoten T-DNA Pflanzenlinien der Konstrukte GUS 1xr, GUS 2xr und GUS 3xr bzw. der GUS 1xr rDNA 101 T-DNA Pflanzenlinie, kann davon ausgegangen werden, daß keine Beeinflussung der GUS-Aktivität durch promotorlose GUS-Reportergene, d.h. durch DNA Homologie der kodierenden Regionen besteht.

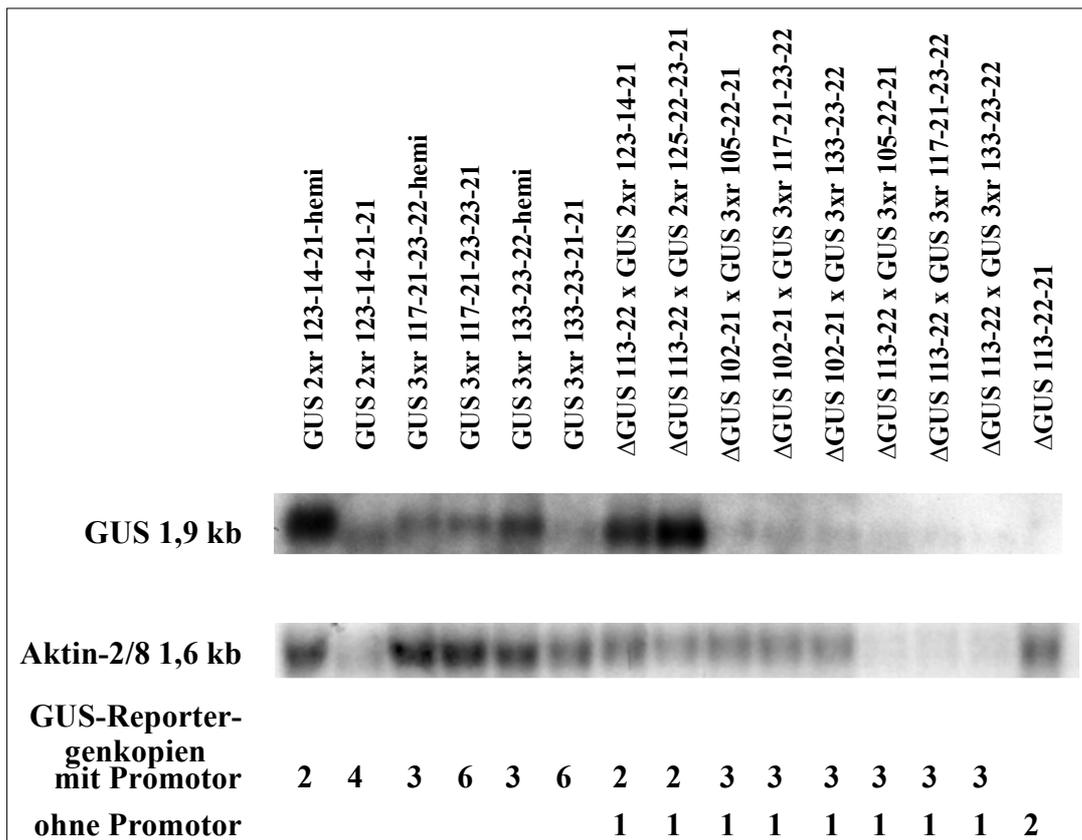


Abb. 3.20 Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der F1 Nachkommen der Kreuzungen der T-DNA Linien ΔGUS und GUS 3xr bzw. GUS 2xr und der für die T-DNA homo- und hemizygoten Linien der Konstrukte GUS 2xr und GUS 3xr
Zur RNA-Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS und anschließend mit einer Aktin-2/8 Sonde hybridisiert (An, *et al.*, 1996). Als Kontrolle wurde RNA der Linie ΔGUS 113-22-21 verwendet. Die für die T-DNA hemizygoten Pflanzen sind mit dem Zusatz „hemi“ bezeichnet.
Die Ausschnitte zeigen die Ergebnisse der jeweiligen Hybridisierungen. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der Aktin-Sonde zeigen eine unterschiedliche Beladung des RNA Gels.

3.3.1.7 β-Glucuronidase Expressionsanalysen der GUS S/AS f Transformanten und der F1 Nachkommen der Kreuzungen, deren T-DNAs das β-Glucuronidasegen in antisense und sense Orientierung tragen

Semiquantitative und quantitative GUS-Expressionsanalysen von Pflanzenlinien, deren T-DNA die Konstrukte GUS 3xr bzw GUS 3xf tragen, verdeutlichen eine starke Verringerung der Expression des Transgens im Vergleich zu T-DNA Pflanzenlinien mit dem Konstrukt GUS 1xr bzw. GUS 1xr. Zusätzlich weisen die analysierten T-DNA Linien der Konstrukte GUS 3x einen Abfall der Reporterogenaktivität im Laufe der Entwicklung auf (vergl. M. Gils, 2000, D. Schubert, 1999).

In Abbildung 3.21 sind die quantitativen GUS-Aktivitätstests für homozygote GUS 3xr Pflanzenlinien denen mit GUS S/AS f T-DNAs vergleichend gegenübergestellt. Die

homozygoten T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes GUS S/AS f enthalten zwei GUS-Reporter gene in *sense* und zwei in *antisense* Genorientierung. Im Laufe der Entwicklung nimmt die Aktivität in den meisten Transformanten GUS 3xr und GUS S/AS f ab, wobei bereits die zwei Wochen alten GUS S/AS f Transformanten geringere Expression aufweisen. Nach acht Wochen alte Pflanzen weisen alle Pflanzen eine vergleichbar niedrige GUS-Aktivität auf.

Die starke Verringerung der Expression in den für die T-DNA homozygoten Linien der Konstrukte GUS 3xr und GUS S/AS f im Vergleich zu homozygoten Pflanzenlinien mit GUS 1xr T-DNAs konnte anhand von Northern Blot Analysen bestätigt werden (vergl. Abb. 3.22).

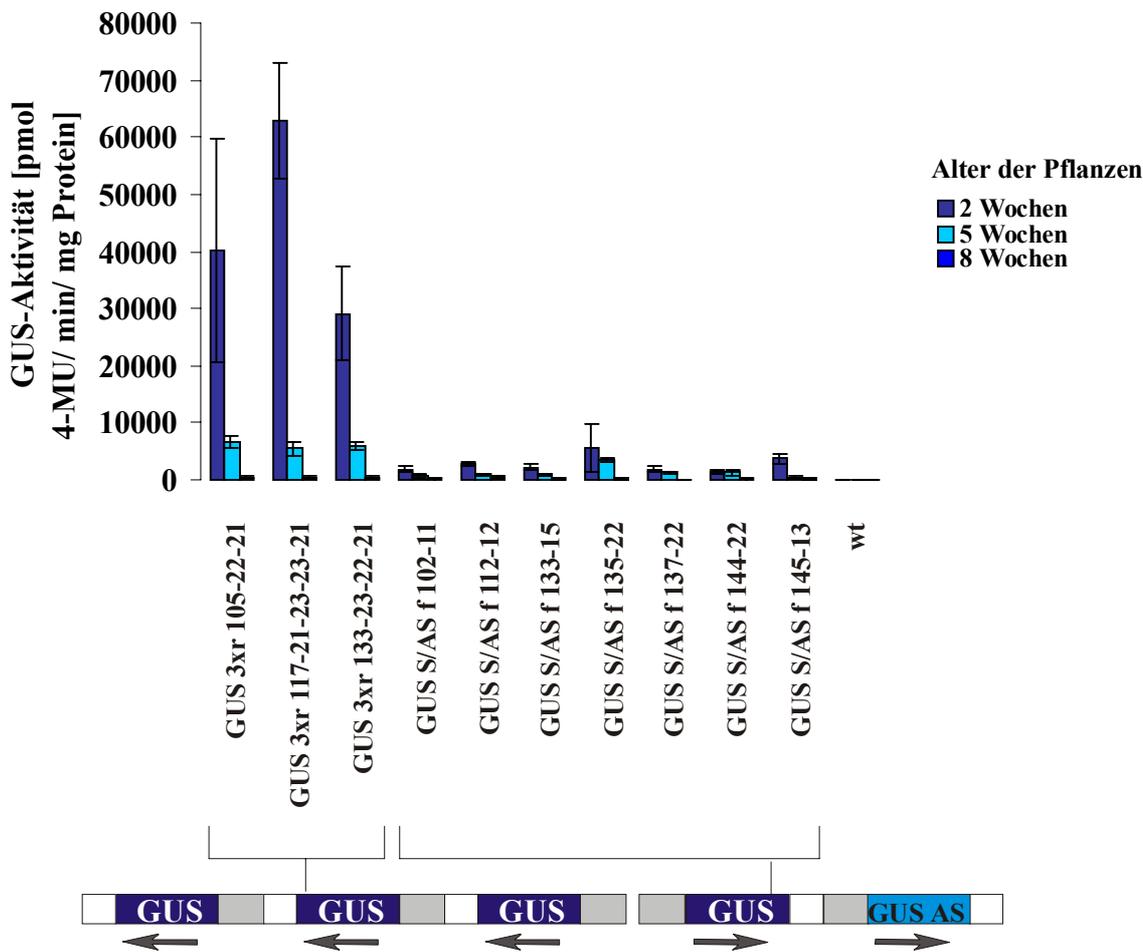


Abb. 3.21 Vergleich der GUS-Aktivität der für die T-DNA homozygoten Pflanzen, die T-DNAs mit drei GUS-Reporter genkassetten (GUS 3xr) bzw. T-DNAs mit einer GUS-Reporter genkassette in *sense* und einer GUS-Reporter genkassette in *antisense* Orientierung (GUS S/AS f) beinhalten. Dargestellt sind die Meßwerte, die von 2, 5 und 8 Wochen alter Pflanzen erstellt wurden. Das Blattmaterial der Proteinextrakte wurde von 5-10 Pflanzen entnommen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Anordnung der GUS-Reporter genkassetten in den T-DNAs ist schematisch aufgeführt.

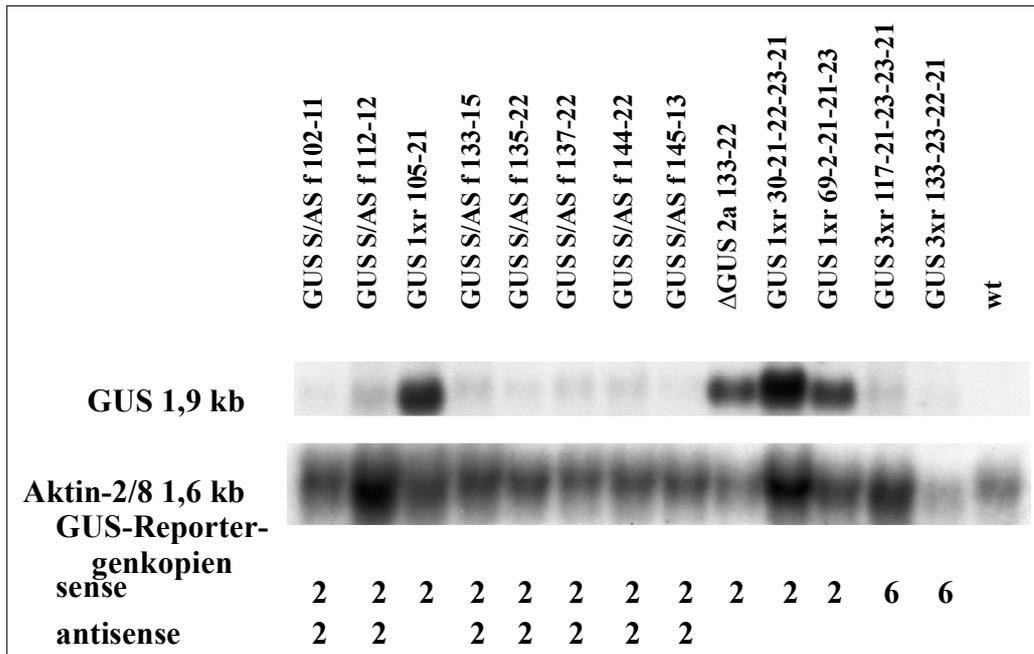


Abb. 3.22 Northern Blot Analyse der für die T-DNA homozygoten Pflanzen des Konstruktes GUS S/AS f im Vergleich zu homozygoten GUS 1x und GUS 3x T-DNA Pflanzenlinien
Zur RNA Präparation wurden 8 Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS und anschließend mit einer Aktin-2/8 Sonde hybridisiert (An, *et. al.*, 1996). Die Ausschnitte zeigen die Ergebnisse der Hybrisierungen mit den jeweiligen Sonden.

Es wurden Kreuzungen der für die T-DNA homozygoten Pflanzenlinien GUS AS r und der homozygoten T-DNA Pflanzenlinien der Konstrukte GUS 1x, GUS 2x, der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 bzw. GUS 3x durchgeführt. Diese ergeben für die F1 Nachkommen jeweils eine *antisense* GUS-Reporter genkopie sowie eine, zwei bzw. drei *sense* GUS-Reporter genkopien. Kreuzungen wurden für zwei GUS AS r Transformanten und jeweils zwei bis drei GUS 1xr, GUS 2xr und GUS 3xr Transformanten durchgeführt. Abbildung 3.23 zeigt exemplarisch die GUS-Aktivitäten der F1 Nachkommen der Kreuzung der homozygoten GUS AS r 107 T-DNA Linie mit den homozygoten GUS 1x, GUS 2x, GUS 3x Transformanten und der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101. Zum Vergleich sind Ergebnisse der für die T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzen des Konstruktes GUS 3xr aufgeführt. Die Präsenz einer *antisense*-Genkopie bewirkt unabhängig davon, ob ein, zwei oder drei Kopien des GUS *sense* Gens vorliegen, eine Reduktion der GUS-Reporter genaktivität. Diese ist bereits in zwei Wochen alten Pflanzen deutlich ausgeprägt. Das Expressionsniveau ist vergleichbar zu GUS-Aktivitäten der homozygoten GUS S/AS f Transformanten.

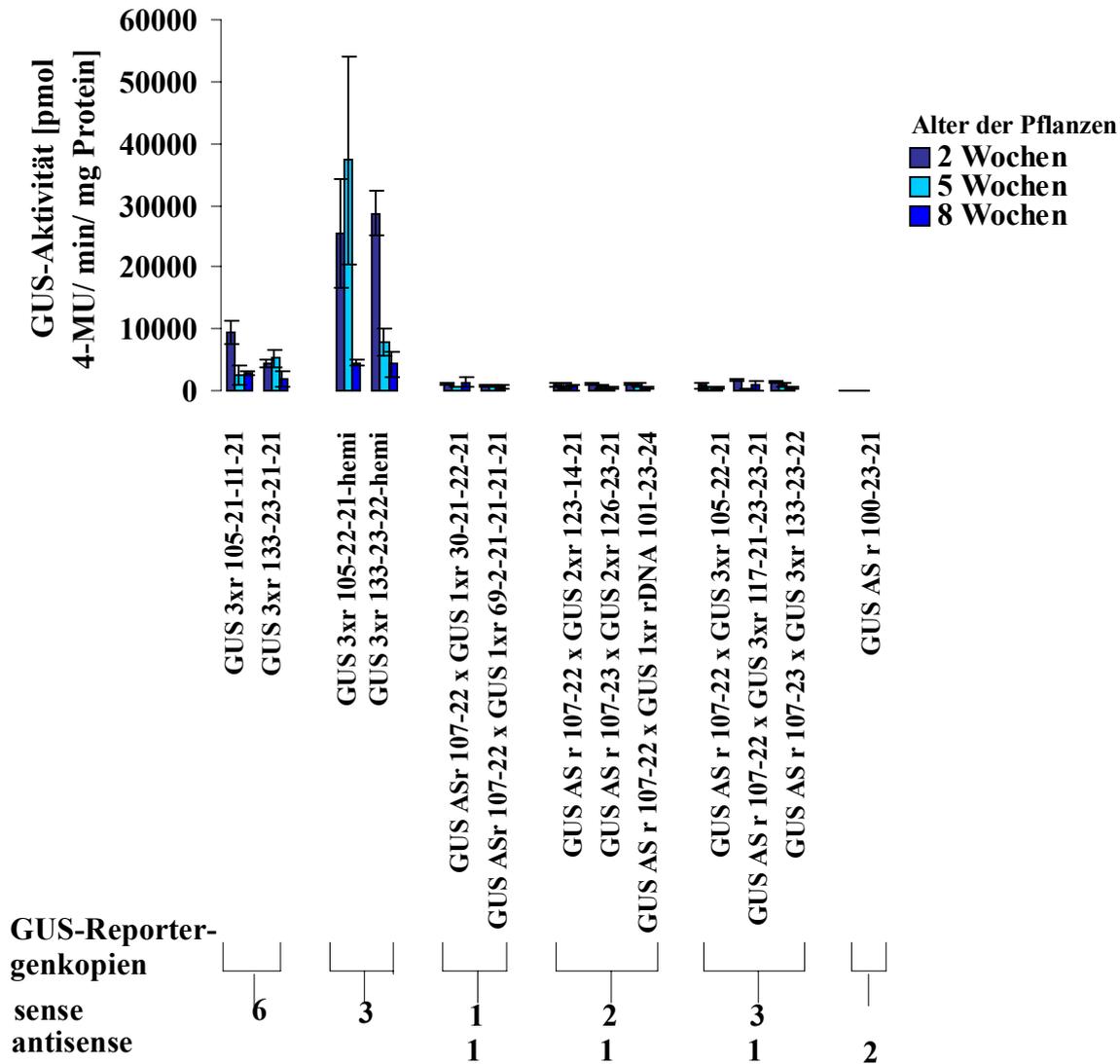


Abb. 3.23 GUS-Aktivitäten der für die GUS 3xr T-DNA homo- und hemizygoten Pflanzen und der F1 Nachkommen der Kreuzungen der Pflanzenlinien der T-DNA GUS AS r und der Pflanzenlinien GUS 1xr, GUS 2xr, GUS 3xr und der Pflanzenlinie GUS 1xr rDNA 101. Zur Herstellung der Extrakte wurde Blattmaterial von 5-10 Pflanzen vereint. Die Messung der GUS-Aktivität erfolgte für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angegeben. Die Anzahlen der in den einzelnen Linien enthaltenen *sense* und *antisense* GUS- Reporter genkopien sind angegeben.

Die F1 Nachkommen der Kreuzungen der *antisense* T-DNA Linie GUS AS r 100 mit den dargestellten (Abb. 3.23) *sense* T-DNA Linien zeigten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.24 stellt die Ergebnisse der Northern Blot Analysen für die F1 Nachkommen der Kreuzungen der GUS AS r T-DNA Linien mit GUS 1x, GUS 2x bzw. GUS 3x T-DNA Linien dar. Es ist zu erkennen, daß sich die verminderte Aktivität der β -Glucuronidase in den Kreuzungsnachkommen auch auf der Ebene der mRNA-Konzentration widerspiegelt.

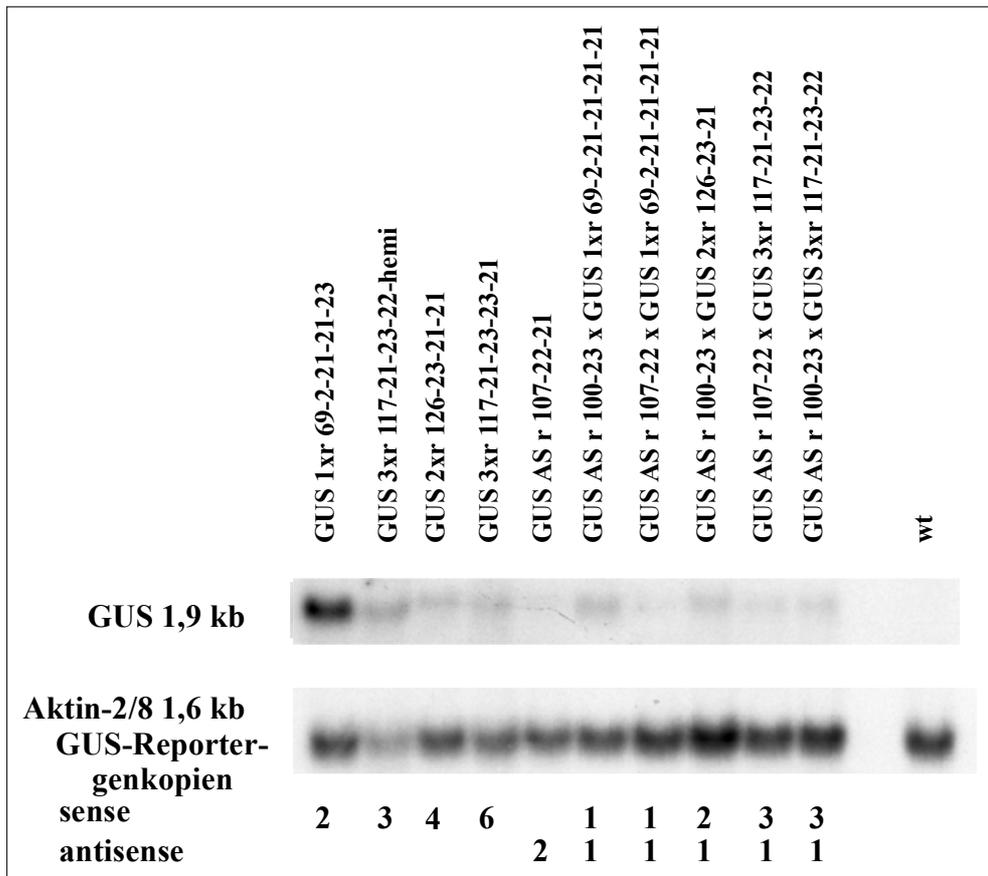


Abb. 3. 24 Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der F1 Kreuzungsnachkommen der Kreuzungen der T-DNA Linien GUS AS r 100 bzw. GUS AS r 107 und der T-DNA Linien, die die Konstrukte GUS 1x, GUS 2x bzw. GUS 3x beinhalten

Zur RNA-Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS und anschließend mit einer Aktin-2/8 (An, *et al.*, 1996) Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde RNA von Wildtyp Pflanzen verwendet. Die Ausschnitte zeigen die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente.

Pflanzenlinien, deren T-DNA das β -Glucuronidase Reportergen in *antisense* Transkriptionsrichtung enthalten (GUS AS r), wurden in ihrer Expression im Vergleich zu Transformanten mit *sense* GUS-Reportergenen (GUS 1xr) analysiert. Die verwendeten T-DNA homozygoten Linien tragen jeweils zwei Kopien des GUS Reportergens unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. In Abbildung 3.25 ist die Northern Blot Analyse dieser T-DNA Pflanzenlinien dargestellt. Die GUS-mRNA-Konzentration in den GUS AS r T-DNA Pflanzen ist im Vergleich zu den GUS 1xr T-DNA Pflanzen deutlich reduziert.

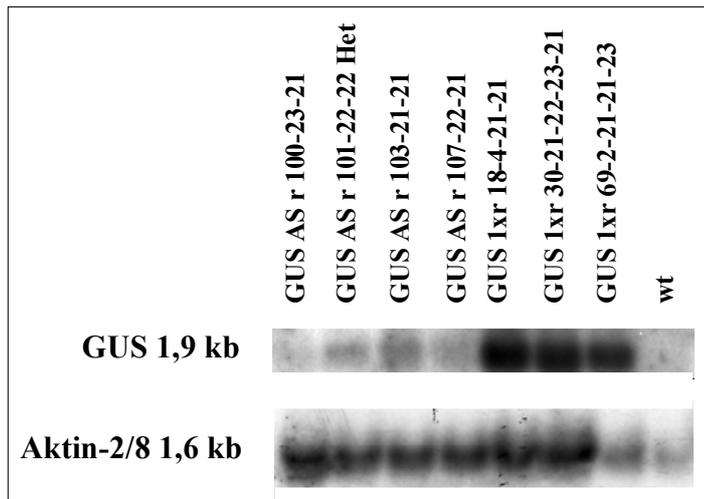


Abb. 3.25 Northern Blot Analyse der für die T-DNA GUS AS r und GUS 1xr homozygoten Linien
 Zur RNA Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GUS und anschließend mit einer Aktin-2-8 Sonde (An. *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde RNA von Wildtyp Pflanzen verwendet. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in den Ausschnitten dargestellt.

3.3.2 Expressionsanalysen des GFP (*green fluorescent protein*) Transgens

Das verwendete GFP Reportergen besitzt eine modifizierte Sequenz, die mit dem ER (endoplasmatisches Retikulum)-Signalpeptid der basischen Chitinase aus *A. thaliana* fusioniert ist (mgfp4-ER; vergl. Haseloff, *et al.*, 1997). Die Fluoreszenz des Proteins kann bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt werden und emittiert bei 510 nm. Setzt man die Fluoreszenz in Bezug zu dem im Pflanzenextrakt ermittelten Gesamtproteingehalt, kann die relative Fluoreszenz ermittelt werden.

Die quantitative Fluoreszenzmessung der transgenen Pflanzen erfolgte 2, 5 und 8 Wochen (2W, 5W, 8W) nach Auslegen der Samen. Pro T-DNA Linie wurden jeweils zwei Messungen von zwei Extrakten unterschiedlichen Blattmaterials erstellt. Dadurch ergeben sich pro T-DNA Pflanzenlinie vier Meßwerte, die zur Auswertung herangezogen wurden. Die Gesamtproteinkonzentration wurde ebenfalls pro Pflanzenextrakt doppelt bestimmt. Der erhaltene Mittelwert wurde als Bezugsgröße in die Berechnung der beiden Fluoreszenzmeßwerte des entsprechenden Extraktes einbezogen. Der Mittelwert der vier GFP-Aktivitätswerte ergibt die relative GFP-Fluoreszenz mit der entsprechenden Standardabweichung.

3.3.2.1 Ermittlung der Vergleichbarkeit der relativen GFP Fluoreszenzanalysen für transgene Pflanzen unterschiedlicher Generationen und Versuchsreihen

Die quantitative Messung der GFP Fluoreszenz der T-DNA Pflanzenlinien der Konstrukte mGFP 1xf und mGFP 1xr erfolgte für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Anhand der genetischen und molekularen Analyse wurden acht Linien etabliert, die jeweils eine vollständige T-DNA Kopie im Pflanzengenom tragen.

Die Vergleichbarkeit der quantitativen relativen Fluoreszenzbestimmung wurde zunächst anhand verschiedener homozygoter mGFP 1xf Transformanten überprüft. Dazu wurden zwei Meßreihen durchgeführt. In einer Meßreihe wurden die zu untersuchenden transgenen Linien zum gleichen Zeitpunkt ausgesät und nach 2, 5 und 8 Wochen in einem Experiment gemessen. Die Linearität der relativen Fluoreszenz im Verhältnis zur verwendeten Proteinkonzentration wurde anhand eines GFP Standards und mit Hilfe verschiedener Verdünnungen von Proteinextrakten von transgenen Linien bestätigt (Daten nicht gezeigt). Tabelle 3.18 zeigt, daß in beiden Versuchsreihen vergleichbare Werte erhalten wurden. Meßreihe eins enthält ausschließlich Pflanzen der T4-Generation, während Meßreihe zwei T-DNA sowohl Individuen der T4 als auch der T5- Generation enthält. Daher ist ein Vergleich zwischen T-DNA Pflanzenlinien eines Konstruktes innerhalb der jeweiligen Meßreihe und ein Vergleich zwischen gleichen und unterschiedlichen Generationen in zwei Meßreihen gegeben. Die in der Tabelle hervorgehobenen Fluoreszenzwerte stellen die Mittelwerte der Messungen zweier unabhängiger Proteinextrakte dar. Die Proteinextrakte wurden doppelt gemessen und die jeweiligen Werte in der Tabelle aufgeführt. Die größten Unterschiede zwischen den Transformanten des Konstruktes mGFP 1xf einer Meßreihe bestehen in Meßreihe 1 nach 2 Wochen zwischen der Linie mGFP 1xf 107-22-24-21 und der Linie mGFP 1xf 128-22-23-21 mit einem Faktor von 1,3. Transformanten verschiedener Meßreihen unterscheiden sich um den Faktor 1,5 nach fünf Wochen (mGFP 1xf 8). Pflanzen der T4 und T5 Generation zeigen Meßwerte, die maximal um den Faktor 1,5 voneinander abweichen. Die größten Unterschiede weisen 2 Wochen alte Pflanzen der T-DNA Linie mGFP 1xf 8 bzw. 2 Wochen alte Pflanzen der T-DNA Linie mGFP 1xf 128 auf.

Es wird deutlich, daß die relativen Fluoreszenzwerte der jeweiligen T-DNA Linien in unterschiedlichen Meßreihen unabhängig von der Generation keine wesentlichen Änderungen aufweisen. Vergleichbare Ergebnisse wurden anhand der T-DNA Pflanzenlinien des Konstruktes mGFP 1xr erhalten (Daten nicht gezeigt).

Linie	Generation/ Meßreihe	Messungen		Messungen		Mittelwert	Standardabweichung
		Extrakt	I	Extrakt	II		
mGFP 1xf 8-4-21-22 (2W)	T4/ M1	8300	9000	6600	6800	7675	1150
mGFP 1xf 8-4-21-22 (5W)	T4/ M1	7900	8000	7600	7500	7750	250
mGFP 1xf 8-4-21-22 (8W)	T4/ M1	8200	8000	6900	6900	7500	700
mGFP 1xf 8-4-21-21-21 (2W)	T5/ M2	6500	6800	6500	6400	6550	150
mGFP 1xf 8-4-21-21-21 (2W)	T5/ M2	5500	4900	5100	5200	5175	250
mGFP 1xf 8-4-21-21-21 (2W)	T5/ M2	5500	5200	4900	5000	5150	250
mGFP 1xf 18-2-22-21 (2W)	T4/ M1	6500	6100	6500	6700	6450	250
mGFP 1xf 18-2-22-21 (5W)	T4/ M1	6100	6200	6500	6200	6250	150
mGFP 1xf 18-2-22-21 (8W)	T4/ M1	6100	6200	6400	6300	6250	150
mGFP 1xf 18-2-22-21-21 (2W)	T5/ M2	4900	4400	4100	4200	4400	350
mGFP 1xf 18-2-22-21-21 (5W)	T5/ M2	4900	5000	4800	4900	4900	100
mGFP 1xf 18-2-22-21-21 (2W)	T5/ M2	4800	4900	5300	5400	5100	300
mGFP 1xf 107-22-24-21 (2W)	T4/ M1	8000	7600	8400	8200	8050	350
mGFP 1xf 107-22-24-21 (5W)	T4/ M1	5800	5800	6100	5300	5750	350
mGFP 1xf 107-22-24-21 (8W)	T4/ M1	6000	6200	6100	6100	6100	100
mGFP 1xf 107-22-25-21 (2W)	T4/ M2	7400	7400	6600	6600	7000	450
mGFP 1xf 107-22-25-21 (2W)	T4/ M2	4000	4000	5700	5600	4825	950
mGFP 1xf 107-22-25-21 (2W)	T4/ M2	5300	5400	5100	4900	5175	200
mGFP 1xf 128-22-23-21 (2W)	T4/ M1	5600	6200	7100	6600	6375	650
mGFP 1xf 128-22-23-21 (5W)	T4/ M1	6400	6500	6400	6700	6500	150
mGFP 1xf 128-22-23-21 (8W)	T4/ M1	7500	7100	6900	6600	7025	400
mGFP 1xf 128-22-23-22 (2W)	T4/ M2	6200	6500	7100	6900	6675	400
mGFP 1xf 128-22-23-22 (5W)	T4/ M2	4700	4800	4600	4700	4700	100
mGFP 1xf 128-22-23-22 (8W)	T4/ M2	5200	5000	4800	5200	5050	200

Tabelle 3.14: Vergleich der relativen Fluoreszenzwerte zweier Meßreihen homozygoter *A. thaliana* Linien, die die T-DNAs mGFP 1xf tragen

Die Angaben der Aktivitätsbestimmung sind in relativer Fluoreszenz/mg Protein angegeben. Die Meßwerte sind für 2 (2W), 5 (5W) und 8 (8W) Wochen alte Pflanzen aufgeführt. Der Mittelwert (hervorgehoben dargestellt) wurde aus vier Messungen ermittelt. Die Generationen der untersuchten transgenen Linien sind durch die Bezeichnung T4 bzw. T5 angegeben, wobei die Bezeichnung T0 den transformierten Pflanzen entspricht. Die Meßreihen 1 und 2 sind durch die Abkürzungen M1 und M2 angegeben.

3.3.2.2 GFP-Expressionsanalysen der für die T-DNAs mGFP 1xf und mGFP 1xr homo- und hemizygoten Pflanzen

Abbildung 3.26 enthält die relativen GFP Fluoreszenzen in einer Gegenüberstellung der für die T-DNA homozygoten und hemizygoten mGFP 1xf und mGFP 1xr Pflanzen. Wie zu erkennen ist, führt die Reduktion der Zahl der Reportergenkassetten in allen Fällen zu einer Verminderung der relativen GFP Fluoreszenz. Die Werte der homozygoten T-DNA Pflanzen sind etwa doppelt so hoch wie die der hemizygoten Transformanten. Insgesamt wird deutlich, daß jeweils die für die T-DNA homozygoten und die für die T-DNA hemizygoten Linien eine einheitliche relative Fluoreszenz aufweisen.

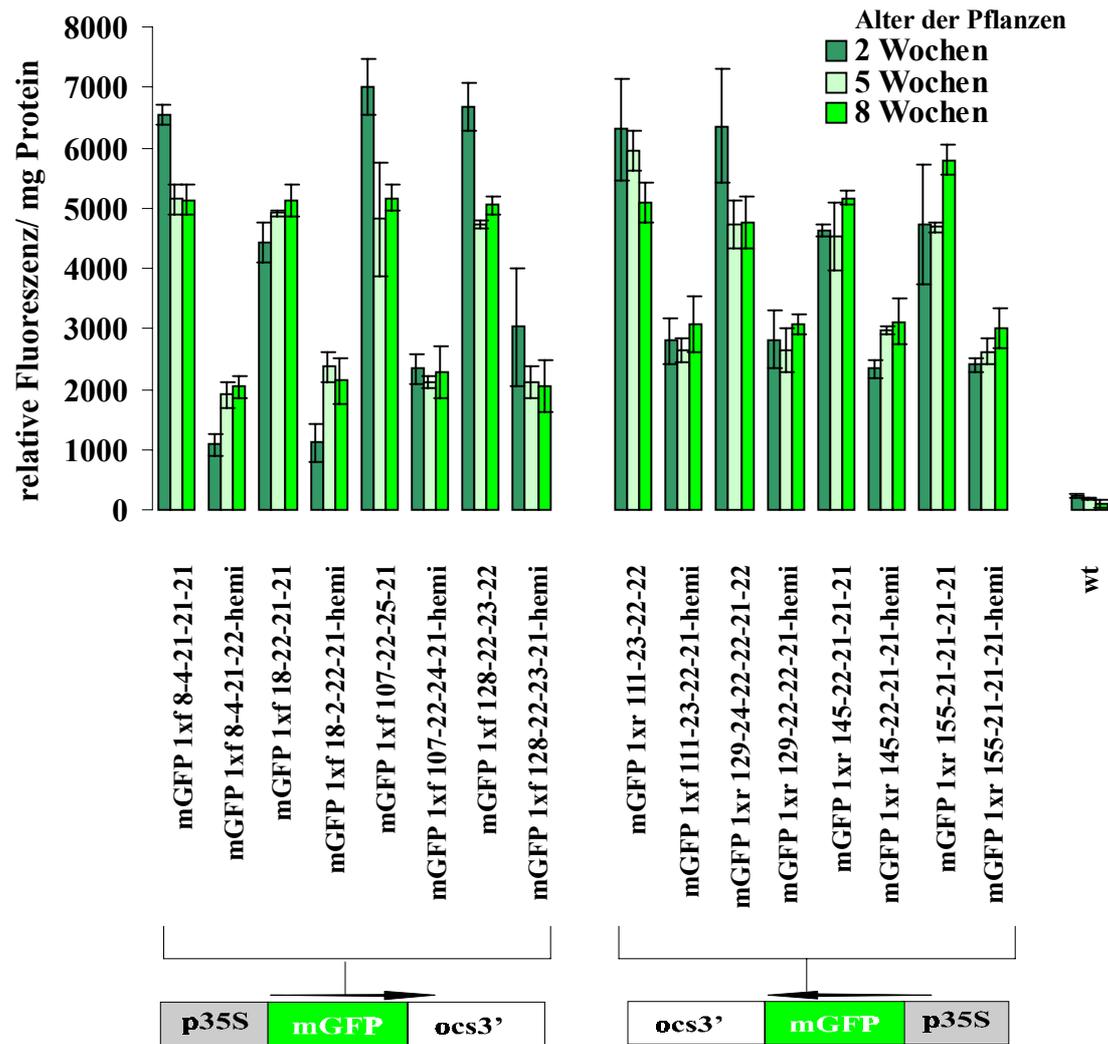


Abb. 3.26 Vergleich der relativen GFP Fluoreszenz von für die T-DNAs mGFP 1xf und mGFP 1xr homozygoten und hemizygoten T-DNA Pflanzen

Die Meßwerte für die hemizygoten Pflanzen sind mit dem Zusatz „hemi“ versehen.

Die Extrakte wurden aus jungen Rosettenblättern von 5-10 Pflanzen der jeweiligen T-DNA Linie hergestellt. Die Messung erfolgte für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Die Übertragung der Pflanzen von axenischer Kultur in Erde erfolgte nach der ersten Messung. Die Standardabweichungen, die sich aus beiden Messungen der Proteinextrakte ergeben, sind als Fehlerbalken angegeben.

Zwischen den Pflanzen mit mGFP 1xr bzw. mGFP 1xf T-DNAs konnten nur geringe Unterschiede in der Fluoreszenz ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, daß die Orientierung der Reporter genkassette relativ zur T-DNA keinen Einfluß auf die Expression des Transgens hat. Vergleichbare Ergebnisse wurden anhand von Northern Blot Analysen erhalten. In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse der Northern Blot Analysen der für die T-DNA homozygoten Linien mGFP 1xf und mGFP 1xr enthalten. Es ist zu erkennen, daß sich die einheitlich hohe Expression für diese Transformanten bestätigen läßt. Gleiches gilt für das Verhältnis der GFP mRNA-Konzentration der für die T-DNA homozygoten Pflanzen im Vergleich zu hemizygoten

Individuen. Abbildung 3.27 enthält exemplarisch den Vergleich der GFP-mRNA-Expression der für die mGFP 1xf T-DNA homozygoten und hemizygoten Pflanzen.

Die T-DNA Linie mGFP 1xf 127 zeigte in den Northern Blot Analysen (vergl. Abb. 3.28) eine erhöhte GFP-mRNA-Menge im Vergleich zu den analysierten Transformanten der Konstrukte mGFP 1xf und mGFP 1xr. Um auszuschließen, daß dies lediglich durch unterschiedliche Mengen an aufgetragener RNA zurückzuführen ist, wurde diese T-DNA Linie weiteren Fluoreszenzanalysen unterzogen.

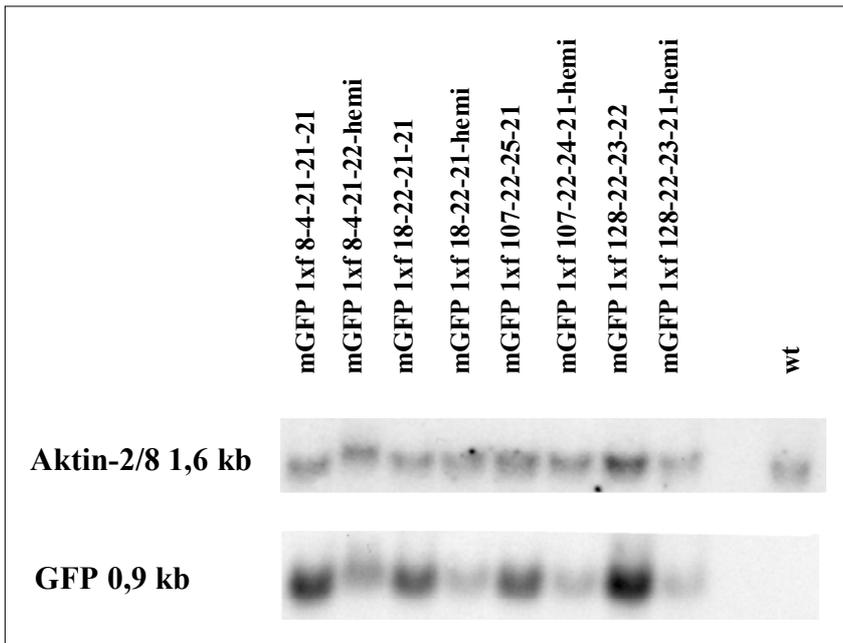


Abb. 3.27 Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der für die T-DNA homo- und hemizygoten Linien mGFP 1xf
 Zur RNA Präparation wurden junge Rosettenblätter 8 Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GFP und anschließend mit einer Aktin 2/8 Sonde (An *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde Wildtyp RNA (wt) verwendet. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente sind in den Ausschnitten dargestellt. Die für die T-DNA hemizygoten Pflanzen sind durch den Zusatz „hemi“ gekennzeichnet.

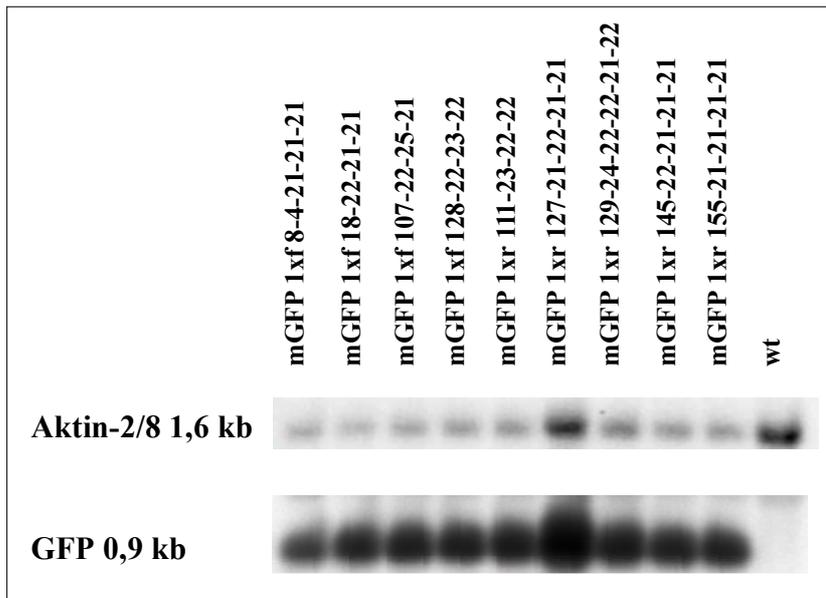


Abb. 3.28 Northern Blot Analyse zum Vergleich der Expression der für die T-DNA homozygoten Linien mGFP 1xf und mGFP 1xr.

Zur RNA Präparation wurden junge Rosettenblätter von 8 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Membran wurde zuerst mit einer GFP und anschließend mit einer Aktin-2/8 Sonde (An *et al.*, 1996) hybridisiert. Als Kontrolle wurde Wildtyp RNA (wt) verwendet. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente sind in den Ausschnitten dargestellt.

3.3.2.3 Fluoreszenzanalysen der T-DNA Linie mGFP 1xr 127

Die Ermittlung der relativen Fluoreszenz der hemi- und homozygoten Pflanzen der Linie mGFP 1xr 127 ergab ca. doppelt so hohe Werte, wie die anderen mGFP 1x Pflanzen. In Abbildung 3.29 sind diese im Vergleich zu homozygoten Transformanten des Konstruktes mGFP 1xr dargestellt. Die Fluoreszenz der für die T-DNA hemizygoten mGFP Pflanzen entspricht der homozygoten mGFP 1xr T-DNA Linien.

Southern Blot und iPCR Daten (vergl. Abb. 3.3) ergaben, daß bei der T-DNA Linie mGFP 1xr 127 zwei T-DNAs an einem Locus vorliegen. Diese Kopien liegen in RB-RB invertierter Orientierung zueinander vor. Die für die T-DNA homozygoten Pflanzen enthalten daher 4 Reportergenkopien, während die hemizygoten zwei einhalten. Die Erhöhung der Reportergenkopienzahl bewirkt eine Erhöhung der GFP Fluoreszenz.

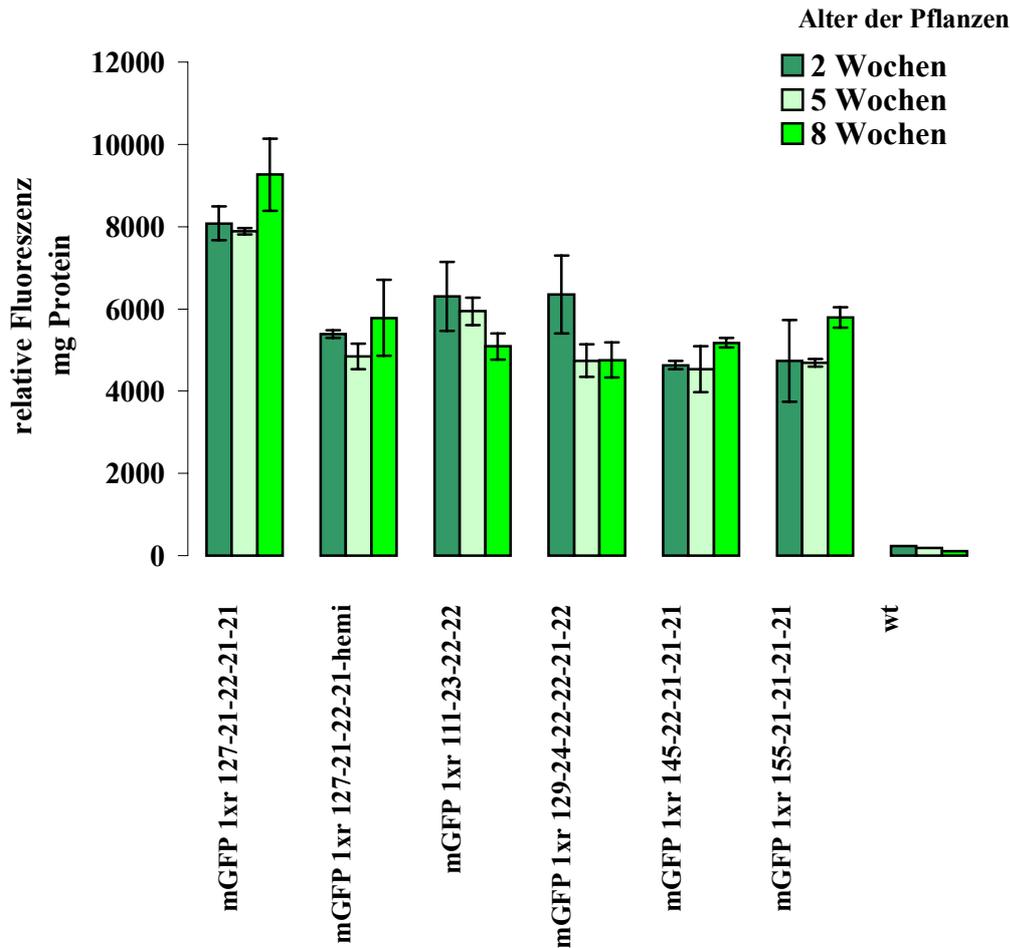


Abb. 3.29 Vergleich der relativen GFP Fluoreszenz der für die T-DNA homo- und hemizygoten Linie mGFP 1xr 127 zu homozygoten T-DNA Linien des Konstruktes mGFP 1xr. Die Meßwerte der hemizygoten Pflanzen sind mit dem Zusatz „hemi“ bezeichnet. Die Extrakte wurden aus jungen Rosettenblättern von 5-10 Pflanzen der jeweiligen T-DNA Linie hergestellt. Die Messung erfolgte für 2, 5 und 8 Wochen alte Pflanzen. Die Standardabweichungen, die sich aus beiden Messungen der Proteinextrakte ergeben, sind als Fehlerbalken angegeben.

3.3.3 Reporterexpression und Kartierung der T-DNA Integration im Pflanzengenom

26 Transformanten der Konstrukte GUS 1xr *repeat* zeigten eine einheitliche hohe und über mehrere Generationen stabile GUS-Aktivität. Von diesen Transformanten konnte für 22 der Integrationsort der T-DNA ermittelt werden (3.2). Diese befinden sich an unterschiedlichen Genompositionen. Von acht Transformanten der Konstrukte mGFP 1x konnten fünf der T-DNA Integrationsorte ermittelt werden. Die mGFP 1x Transformanten zeigten an unterschiedlichen Genompositionen eine einheitlich hohe Reporterexpression. Einheitliche Reporterexpression für verschiedene Transformanten konnte ebenfalls für die GUS AS r, GUS S/AS f und ΔGUS 2a Transformanten ermittelt werden. Von zwei ΔGUS 2a Transformanten konnten zwei, von vier GUS AS r Transformanten zwei und von sieben GUS S/AS f Transformanten vier Integrationsorte ermittelt werden. (Abb. 3.7)

4 Diskussion

4.1 Die Etablierung der zur Analyse verwendeten *A. thaliana* Transformanten

4.1.1 Stabilität der verwendeten T-DNA Konstrukte in *E. coli*, *A. tumefaciens* und *A. thaliana*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten T-DNA Konstrukte, die eine Kopie des β -Glucuronidase- oder GFP-Reportergens aufwiesen, zeigten in Bakterien keine Hinweise auf Rekombinationsereignisse. Im Gegensatz dazu wurde für das T-DNA Konstrukt Δ GUS 2a in *Agrobakterien* häufig der Verlust einer der Reportergenkopien beobachtet. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen, die für ähnliche Reportergenkonstrukte mit multiplen Kopien des β -Glucuronidasegens beobachtet wurden (D. Schubert, 1999).

Rekombinationen innerhalb der T-DNA Konstrukte von Reportergenkassetten mit zwei und drei Kopien sind nicht vollständig auszuschließen, da die *Agrobakterien* bei der *in planta*-Transformation (Bechtold *et al.*, 1993, Clough *et al.*, 1998) eine hohe Zahl an Generationen durchlaufen, bevor es zu einem Transformationsereignis kommt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Transformation von unvollständigen T-DNAs erhöht.

In *A. thaliana* konnte in mehreren aufeinanderfolgenden Generationen eine stabile Erhaltung der T-DNA Konstrukte nachgewiesen werden. Die Stabilität der T-DNA Loci galt ebenfalls für die aus der Kreuzung zweier T-DNA Linien oder die aus der Kreuzung mit einer Wildtyp Pflanze resultierenden F1 Nachkommen.

4.1.2 Transformation von *A. thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen durch verschiedene Transformationstechniken, der *Agrobakterien* vermittelten Wurzeltransformation (Valvekens *et al.*, 1988) und der *Agrobakterien* vermittelten *in planta*-Transformation (Vakuuminfiltration, Bechtold *et al.*, 1993 und „*Floral Dip*“, Clough *et al.*, 1998) erhalten.

Aus Wurzeltransformationsexperimenten wurden regenerierte Pflanzen mit Samenansatz in 53 Fällen gewonnen (s. Tab. 3.1, S. Blencke und M. Gils, unveröffentlicht). Aus Experimenten der Vakuuminfiltration und des „*Floral Dip*“ konnte eine durchschnittliche Transformationseffizienz von 0,059% (Transformanten/ausgelegte Samen, s. Tab. 3.1) ermittelt werden. Die erhaltene

Transformationseffizienz verdeutlicht, daß durch *in planta*-Transformationen eine große Anzahl unabhängiger *A. thaliana* Transformanten erzeugt werden kann.

4.1.3 Genetische und molekulare Analyse der T-DNA Transformanten

Die Segregationsanalyse der Nachkommen transformierter Pflanzen wurde zur Identifizierung von Pflanzen verwendet, deren T-DNA nur an einem Locus im Pflanzengenom vorliegt. Der Anteil der Transformanten, die eine Aufspaltung der Nachkommenschaft von drei Kanamycin-resistenten Pflanzen zu einer Kanamycin-sensitiven Pflanze aufwiesen, betrug für die verwendeten T-DNA Vektoren durchschnittlich 76% (323 von 424 Pflanzen, vergl. Tabelle 3.2). Die präferentielle Integration von T-DNAs an einem Locus steht in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (Depicker *et al.*, 1985, de Block and Debrouwer *et al.*, 1991 und De Neve *et al.*, 1997).

Southern Blot Analysen dienten zur Identifizierung derjenigen Pflanzen, die lediglich eine einzelne, vollständige Kopie der erwarteten T-DNA trugen (T-DNA-Einzelkopie Linien). In 80% der Transformanten, die T-DNA Insertionen an einem einzigen Locus trugen, lag die T-DNA in mehreren Kopien vor, oder es kam zu anderweitigen Rearrangements, wie z.B. Deletionen (vergl. Tabelle 3.3). Komplexe Integrationsmuster der T-DNA wurden bereits in früheren Untersuchungen in Tabak und *Arabidopsis* analysiert (Mittelsten Scheid *et al.*, 1991, Koncz *et al.*, 1994, De Neve *et al.*, 1997).

Die genaue Charakterisierung der Transgen-Loci vor Beginn der Expressionsstudien der Reportergene ist wichtig, da in einigen Fällen die Beteiligung von inversen Sequenz-Wiederholungen und multiplen Strukturen der T-DNAs an Gen-Silencing gezeigt werden konnte (Linn *et al.*, 1992, Hobbs *et al.*, 1993, Finnegan and McElroy, 1993, 1994, Fink und Bender 1995, Stam *et al.*, 1998, zusammengefaßt in Selker, 1999).

4.2 Die Analyse von T-DNA Integrationen im *A. thaliana* Genom

Die Integration von T-DNA in das Pflanzengenom führte häufig zu kleineren Deletionen an der Integrationsstelle im Pflanzengenom (Matsumo *et al.*, 1990, Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991, Ohba *et al.*, 1995). In seltenen Fällen wurden größere chromosomale Veränderungen wie Translokationen oder umfangreiche Deletionen im Pflanzengenom beobachtet (Nacry *et al.*, 1998, Laufs *et al.*, 1999). Veränderungen der T-DNA Border und des Verbindungsbereiches T-DNA/Pflanzen-DNA wurden in mehreren Untersuchungen analysiert. In *A. thaliana* wurden die o.g. Phänomene an neun T-DNA-Einzelkopie Pflanzenlinien (Mayerhofer *et al.*, 1991 und

Gheysen *et al.*, 1991) sowie in Tabak an zwei T-DNA-Einzelkopie-Pflanzenlinien (Ohaba *et al.*, 1995 und Matsumo *et al.*, 1990) untersucht. Eine detaillierte Charakterisierung der Integrationsstellen von 128 *A. thaliana* Transformanten sollte Aufschluß darüber geben, mit welcher Häufigkeit die beschriebenen Phänomene beobachtet werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten mit Hilfe der iPCR-Methode (Ochman *et al.*, 1988) die an die T-DNA angrenzenden Sequenzbereiche von 128 T-DNA Transformanten amplifiziert werden. In 11 Fällen konnte lediglich Homologie zu Ti-Plasmidsequenzen ermittelt werden. Für die verbleibenden 117 die T-DNA flankierenden Bereiche konnte in 116 (99%) Fällen Homologie zu Sequenzen des *Arabidopsis* Genoms nachgewiesen werden. Die hohe Kartierungseffizienz konnte erzielt werden, da das *A. thaliana* Genom nahezu vollständig sequenziert ist (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Repetitive Bereiche, wie z.B. die Centromerregionen, bleiben allerdings vorerst von den Sequenzierungen ausgeschlossen. Die erhaltene iPCR Sequenz einer Transformante zeigte neben den Sequenzen, die zu den T-DNA-Borderbereichen korrespondieren, keine weitere Homologie zu Sequenzen, die in den Datenbanken vorliegen. Daher besteht die Annahme, daß die T-DNA dieser Transformante in nicht-sequenzierten Bereichen des Genoms integriert ist.

Zur Bestätigung der durch Sequenzhomologie ermittelten Position im *Arabidopsis*-Genom wurden für die flankierenden genomischen Sequenzen relativ zur rechten und linken Border der T-DNA spezifische Oligonukleotide ermittelt. Mit einem spezifischen Oligonukleotid für die linke bzw. rechte Border der T-DNA und den beiden, für die *A. thaliana* DNA spezifischen Oligonukleotiden sollten jeweils zwei PCR Fragmente für die entsprechende T-DNA Linie erhalten werden. Für 77 von 116 (66%) Transformanten konnten PCR-Produkte für beide die T-DNA flankierenden genomischen Bereiche erhalten werden.

Für 39 von 128 Transformanten (30%, vergl. Tabelle 3.7) konnten Vektorsequenzen detektiert werden, die die T-DNA flankieren. In 32 Fällen wurden die Ti-Plasmidsequenzen nachgewiesen, die den T-DNA Bordersequenzen direkt benachbart sind. Dies wurde sowohl für die LB (15 transgene Linien) als auch für die RB flankierenden Bereiche beobachtet (17 Transformanten). In vier Fällen lagen andere Ti-Plasmidsequenzen benachbart zur LB (3 transgene Linien) bzw. RB (1 Transformante) vor. Für drei Transformanten konnten innerhalb der T-DNA flankierenden Bereiche Homologien zu internen Regionen der T-DNA ermittelt werden. Dies deutet auf unvollständige T-DNA Kopien hin, die an vollständige T-DNAs angrenzen.

Ti-Plasmidsequenzen, die benachbart zu den T-DNA-Borderbereichen liegen, wurden auch in früheren Untersuchungen im Pflanzengenom nachgewiesen (Herman *et al.*, 1990, Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991). Es konnten Ti-Plasmidsequenzen benachbart zur linken und rechten T-DNA Border beschrieben werden. Daraufhin wurde ein Modell entwickelt, nach dem es im Verlauf des T-DNA Integrationsprozesses zu einem Durchlesen der Borderschnittstellen kommt. Allerdings kann dies nicht die alleinige Erklärung für die Präsenz von Ti-Plasmidsequenzen im Pflanzengenom sein, da in der vorliegenden Analyse auch Ti-Plasmidsequenzen nachgewiesen werden konnten, die in den T-DNA Vektoren nicht direkt benachbart zu den Bordersequenzen vorliegen.

Für sieben von 128 T-DNA Linien (5%) konnten aufgrund der Charakterisierung der Integrationsstelle zwei T-DNAs an einem Locus detektiert werden. Diese liegen in invertierter Orientierung vor (vergl. 3.2.3.3). Durch die verwendeten Hybridisierungssonden wurden in der Southern Blot Analyse nicht alle Bereiche der T-DNA abgedeckt. Zudem können invertierte T-DNAs der Transformanten nicht erfaßt werden, wenn sich die Größen der beiden flankierenden genomischen Bereiche, die mit den verwendeten Restriktionsenzymen nachgewiesen wurden, entsprachen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Charakterisierung der flankierenden Sequenzen eine wichtige Ergänzung der molekularen Analyse der transgenen Linien darstellt.

Für vier von 128 transgenen Linien (3%) ergab die Untersuchung der die T-DNA flankierenden Bereiche Hinweise auf Translokationen. Für jede dieser Linien konnten zwei unterschiedliche iPCR-Fragmente amplifiziert werden, die auf verschiedenen Chromosomen kartierten. Allerdings kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, daß in diesen transgenen Linien Partialintegrationen von Bordersequenzen vorlagen. Durch genetische Kartierungsexperimente könnte die Präsenz von Translokationen nachgewiesen werden. Interessanterweise wiesen drei der vier Linien T-DNAs in invertierter Orientierung auf (vergl. 3.2.3.5).

In einer Studie von Gheysen *et al.* (1987) wurde ein T-DNA Integrationsvorgang beschrieben, der zu einer 158 bp Duplikation im Tabakgenom führte. Eine parazentrische Translokation (Laufs *et al.*, 1999) und eine komplexe chromosomale Veränderung, die eine Translokation und eine Deletion aufwies (Nacry *et al.*, 1998), wurden durch die Analyse von Integrationen komplexer T-DNA Loci in *Arabidopsis* nachgewiesen.

In der vorliegenden Studie wurde in 121 transgenen Linien mit einer intakten T-DNA Kopie lediglich in einem Fall ein Hinweis auf eine Translokation gefunden. Andererseits wurden in drei von sieben Transformanten, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus aufwiesen, Evidenzen für Translokationen nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, daß dieses Phänomen in T-DNA-Einzelkopie Pflanzenlinien sehr selten auftritt; das Vorliegen mehrerer T-DNAs im Genom scheint hingegen solche Rekombinationsereignisse zu begünstigen.

Bei der *Agrobakterien* vermittelten Transformation kommt es häufig zu mehreren T-DNA Insertionen, sowohl vollständige als auch unvollständige T-DNAs werden in das Genom integriert (Jorgensen *et al.*, 1987, Koncz *et al.*, 1994, De Neve *et al.*, 1997). Durch eine eingehende molekulare Analyse der Pflanzenlinien wurden in der hier vorgelegten Studie multiple und verkürzte T-DNA Integrationen weitgehend identifiziert. Diese Transformanten wurden von weiteren Experimenten ausgeschlossen. Limitiert wird die Analyse unter anderem durch die Tatsache, daß kleine Partialintegrationen der LB- bzw. der RB-Sequenzen nicht zu erkennen sind. Für zwei transgene Linien konnten durch iPCR Analysen kleine Partialintegrationen der LB- bzw. RB-Sequenzen zusätzlich zu einer intakten T-DNA Kopie nachgewiesen werden (vergl. 3.2.3.4). Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit, bei der Charakterisierung von Insertionsmutanten sicherzustellen, daß die Mutation durch eine T-DNA Integration bedingt ist und nicht durch andere chromosomale Veränderungen.

4.2.1 Molekulare Sequenzanalyse der T-DNA Integrationen in *A. thaliana*

Zur Sequenzanalyse der T-DNA Integrationen wurden ausschließlich die Transformanten verwendet, deren ermittelten Integrationsorte für beide Bereiche, die die T-DNA flankierten, bestätigt werden konnten. Die Sequenzen der PCR-Produkte, die T-DNA und Pflanzen-DNA umfaßten, wurden ermittelt und mit der Sequenz der zur Transformation verwendeten binären T-DNA Vektoren bzw. der Pflanzen-DNA vor erfolgter Integration verglichen.

Studien in *Agrobacterium tumefaciens* zeigten, daß es im Verlauf des T-DNA Integrationsprozesses zu einem strang- und positionsspezifischem Schneiden innerhalb der rechten und linken direkten Sequenzwiederholungen der T-DNA Border (RB und LB) kommt (Albright *et al.*, 1987, Wang *et al.*, 1987, Dürrenberger *et al.*, 1989). Aufgrund der Schnittstellenpositionen (Pansegrau und Lanka, 1991) sollten vollständig in das Pflanzengenom integrierte T-DNAs, der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten T-DNA-Vektoren, 2 bp der 24 bp langen RB und 22 bp der 24 bp umfassenden LB aufweisen.

Die Sequenzanalysen ergaben für die im *A. thaliana* Genom integrierten T-DNA Borderbereiche eine Einteilung in zwei Klassen (vergl. Abb. 3.4 und 3.5). Klasse eins enthielt, zuzüglich der angrenzenden T-DNA Bereiche, Sequenzen der LB bzw. der RB. Klasse zwei enthielt keine LB- bzw. RB-Sequenzen und zeigte zudem in den meisten Fällen Deletionen der angrenzenden T-DNA Bereiche. Die Sequenzanalyse der LB bzw. der RB ergab für 86% bzw. 25% der Transformanten eine Einteilung in Klasse eins, wobei 23% bzw. 18% der Transformanten Borderendpunkte enthielten, die genau den 22 bp der LB bzw. den 2 bp der RB entsprachen. Die Deletionen in den angrenzenden T-DNA Borderbereichen variierten für den LB Bereich von einem bis 242 bp und für den RB Bereich von einem bis 165 bp. Berücksichtigt man die geringe Länge der RB, war die Integrationsgenauigkeit an der LB und der RB vergleichbar hoch. In den meisten transgenen Linien waren kleinere Deletionen zu beobachten.

Zur Erklärung von Deletionen innerhalb der Borderendbereiche der T-DNA und von verkürzten T-DNAs wurde angenommen, daß die Präsenz borderähnlicher Sequenzen zu einer inkorrekten Prozessierung der T-DNA führt (Lijsebettens *et al.*, 1986, Deroles *et al.*, 1988). T-DNA Brüche im Verlauf des Integrationsprozesses, die durch mögliche Homologien des Pflanzengenoms und des entsprechenden T-DNA Bereichs zustande kommen können, wurden ebenfalls postuliert (Gheysen *et al.*, 1990). In den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch eine zufällige Verteilung der Deletionen innerhalb der Borderbereiche beobachtet (vergl. Abb. 3.4 und 3.5).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen die Modellvorstellung von T-DNA Brüchen im Verlauf des Integrationsprozesses.

Untersuchungen in Tabak und *Arabidopsis* an 11 T-DNA-Einzelkopie Pflanzen (Gheysen *et al.*, 1991, Mayerhofer *et al.*, 1991, Matsumo *et al.*, 1990, Ohaba *et al.*, 1995) ergaben für 82% (LB) bzw. 91% (RB) der Endbereiche eine Einteilung in Klasse I, in 9% (LB) bzw. 45% (RB) der Fälle wurden keine Deletionen beobachtet. Anhand dieser Daten und ähnlicher Analysen wurde abgeleitet, daß die RB präziser als die LB in das Pflanzengenom integriert (Zambryski *et al.*,

1982, Hiei, *et al.*, 1994, van der Graaf *et al.*, 1994, Tinland *et al.*, 1995). Der hier vorgelegte wesentlich umfangreichere Datensatz unterstützt dies nicht.

Die Analyse des Verbindungsbereiches T-DNA/Pflanzen-DNA (vergl. Tabelle 3.5) ergab, daß unpräzise Verbindungen, die zusätzliche DNA Sequenzen (*filler* DNA) oder nicht eindeutig der T-DNA oder Pflanzen DNA zuzuordnende Nukleotide (identische Nukleotide) für 86% (LB) bzw. 95% (RB) der transgenen Linien beobachtet werden konnten. In 58%/60% (LB/RB) der Verbindungsbereiche konnten *filler* DNA Sequenzen ermittelt werden, die zu 81% (LB) bzw. 73% (RB) eine Länge von 3 bis 40 bp aufweisen. Identische Nukleotide zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA bestanden sowohl für den relativ zur T-DNA rechten und linken Verbindungsbereich mit 38% (LB) bzw. 25% (RB) in Form von ein bis sechs bp, wobei die meisten (68% LB/78% RB) eine Länge von ein bzw. zwei bp aufwiesen.

Das Vorkommen unpräziser Verbindungsbereiche T-DNA/Pflanzen-DNA wurde bereits für einige transgene Linien beschrieben (Matsumo *et al.*, 1990, Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991, Ohaba *et al.*, 1995). Die Untersuchung von elf Transformanten konnte für zwei Verbindungsbereiche *filler* DNA nachweisen. In drei Fällen konnten identische Nukleotide nachgewiesen werden. Eine präzise Verbindung zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA lag in zehn Verbindungsbereichen vor. Der hier ermittelte Datensatz erlaubte anhand von 73 transgenen Linien erstmals eine Abschätzung der Häufigkeit präziser und unpräziser Verbindungsbereiche.

In der Studie von Gheysen *et al.* (1991) wurde das Zustandekommen von *filler* Nukleotiden dadurch erklärt, daß an der Integrationsstelle eine zufällige Addition von Nukleotiden erfolgt. Alternativ wurde ein komplexer Reparaturprozeß mit T-DNA oder Pflanzen-DNA als Matrize vorgeschlagen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten für längere *filler* DNAs (>20 Nukleotide) keine Homologien zum Pflanzengenom oder zu T-DNA Vektoren nachgewiesen werden. Dies unterstützt das Modell, in dem die zufällige Addition von Nukleotiden an der Integrationsstelle angenommen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Deletionen des genomischen Integrationsorts in 93% der Transformanten mit einer Länge von zwei bis 960 bp ermittelt werden. Lediglich für zwei transgene Linien konnte keine Deletion ermittelt werden. Für drei Transformanten konnte ein Nukleotid nicht eindeutig dem rechten oder linken T-DNA flankierenden genomischen Bereich zugeordnet werden. Die Häufigkeit von Deletionen innerhalb der Integrationsstelle der T-DNA im Pflanzengenom ist konform mit Ergebnissen früherer Studien (Matsumo *et al.*, 1990, Mayerhofer *et al.*, 1991, Gheysen *et al.*, 1991).

4.2.2 Analyse der chromosomalen Verteilung integrierter T-DNAs

Zur Analyse der Verteilung integrierter T-DNAs entlang der *A. thaliana* Chromosomen wurden ausschließlich Einzelkopie-Transformanten verwendet, deren ermittelte Integrationsorte für beide die T-DNA flankierenden genomischen Bereiche bestätigt werden konnten und die Linien, die für einen T-DNA flankierenden Bereich Ti-Plasmidsequenzen und für den anderen bestätigte genomische Bereiche aufwiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *A. thaliana* T-DNA-Einzelkopie Pflanzen zeigten vergleichbar zu Untersuchungen in *Crepis capillaris* (Ambros *et al.*, 1986), Tomate (Ghyi, *et al.*, 1986), *Petunia* (Wallroth *et al.*, 1986) und *Arabidopsis* (Liu *et al.* 1995, Smith *et al.*, 1996, Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997) eine Verteilung der T-DNA Integrationen entlang der Chromosomen (vergl. Abb. 3.7).

Es wurde außerdem untersucht, ob die T-DNAs in Genen oder in repetitiven Elementen vorlagen. Eine von 105 kartierten T-DNAs lag in rDNA-Sequenzen vor, während zwei Linien in mobilen Elementen integriert waren (Tabelle 3.8, 3.9). Die Ermittlung von chromosomalen Loci war für zwei dieser T-DNA Integrationen nicht möglich, da die Häufigkeit dieser Elemente eine eindeutige Kartierung aufgrund von Sequenzhomologie nicht zuließ. Mobile Elemente machen 10% des *Arabidopsis*-Genoms aus, während weitere 10% des Genoms aus in tandem organisierten repetitiven Elementen bestehen (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Dies zeigt eindeutig, daß T-DNA Integrationen in repetitiven Bereichen des *Arabidopsis*-Genoms unterrepräsentiert waren.

In Genbereichen konnten 30% der T-DNA Integrationen detektiert werden (vergl. Tab. 3.8). In nicht-repetitiven Segmenten des Genoms entsprechen ca. 40% der Sequenzen den kodierenden Bereichen (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Damit wich die Häufigkeit der T-DNA Integrationen in intergenischen bzw. genischen Regionen nur geringfügig von der Verteilung dieser Bereiche im *Arabidopsis*genom ab.

4.3 Die Analyse der Reporterexpression

4.3.1 *A. thaliana* Transformanten, die vor dem 35S CaMV Promotor der Reporterengenkassette 35S::GUS::ocs3' repetitive Elemente tragen, weisen eine einheitlich hohe Expression auf

Durch genetische und molekulare Analysen konnten insgesamt 26 T-DNA Einzelkopielinien in *A. thaliana* erhalten werden, die unmittelbar benachbart zu einem chimären β -Glucuronidasegen verschiedene repetitive Elemente trugen (GUS 1xr repeat). Die Analyse der GUS-Reportergenaktivität ergab, daß diese Transformanten eine einheitlich hohe und über mehrere

Generationen stabile GUS-Aktivität und Expression aufwiesen (s. 3.3.1.). Die in den T-DNAs vorliegenden repetitiven Elemente unterscheiden sich sowohl in der Länge (360 bp – 4000 bp) als auch in der Kopienzahl (50 – 5500), in der sie im *Arabidopsis*-Genom vorliegen. Einige der Elemente sind in tandem organisiert (pAL, 500, *SalI* rDNA Spacer), andere kommen verteilt in den Centromerregionen vor (163, 164) (pAL und 500: Martinez-Zapater *et al.*, 1986, Simoens *et al.*, 1988, 163 und 164: Thompson *et al.*, 1996, *SalI* rDNA Spacer: Gruendler *et al.*, 1991). Trotzdem konnte für keines der verschiedenen repetitiven Elemente ein Einfluß auf die Reporterexpression nachgewiesen werden (vergl. Tab. 3.12), in allen Fällen war die Genexpression vergleichbar hoch wie in transgenen Pflanzen, die lediglich die 35S::GUS::ocs3' Reporterexpressionskassette (M. Gils, 2000) trugen (vergl. Abb. 3.9 und 3.10).

Es wurden Kreuzungen von Transformanten vorgenommen, deren T-DNAs vor dem 35S CaMV Promotor des GUS-Reportergens unterschiedliche repetitive Elemente aufwiesen. GUS-Aktivitätsmessungen der F1 Nachkommenschaft zeigten ebenfalls in allen untersuchten Fällen eine einheitlich hohe GUS-Aktivität, die vergleichbar hoch war wie die homozygoter Transformanten mit einer 35S::GUS::ocs3' Reporterexpressionskassette (vergl. Abb. 3.17). Ebenso hohe Werte wurden in Expressionsanalysen von F1 Nachkommenschaften von Kreuzungen zweier GUS 1x Transformanten gefunden (D. Schubert, unveröffentlicht).

In *Drosophila* wurde ein Zusammenhang zwischen der chromosomalen Umgebung und der Expression eines Gens nachgewiesen. Integriert ein Gen durch Translokation in oder in die Nähe einer heterochromatischen Region, wurde keine oder eine variegierende Expression beobachtet (zusammengefaßt in Reuter und Spierer, 1992). Dieses als PEV („Position-Effekt-Variation“) bezeichnete Phänomen besitzt auch eine reduzierende Wirkung auf homologe Sequenzen in *trans* (Martin-Morris *et al.*, 1997, Donaldson und Karpen, 1997). Wird z.B. einer der *brown*-Loci in *Drosophila* durch Translokation in eine heterochromatische Region überführt, so kommt es auch zum Silencing einer homologen Kopie des Gens im Euchromatin (Dorer und Heninkoff, 1997). Es wurde die Modellvorstellung entwickelt, daß eine Paarung homologer DNA-Sequenzen zur Induktion von Heterochromatinindomänen führen kann.

Da die einheitliche, hohe und über mehrere Generationen stabile GUS-Aktivität des Reportergens der GUS 1x *repeat* Transformanten keinen Unterschied im Vergleich zu GUS 1x Transformanten aufwies, scheinen die untersuchten repetitiven Elemente, die in *Arabidopsis* im Heterochromatin vorliegen, keinen Einfluß auf die Reporterexpression zu haben. Die Modellvorstellung, daß es durch die Paarung homologer DNA Sequenzen zu einer Induktion von Heterochromatin kommt, konnte daher in *A. thaliana* bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

In einer Untersuchung von Borisjuk *et al.* (2000) in Tabak wurde eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein der *cis*-agierenden *aps* Sequenz (*amplification-promoting sequence*) des ribosomalen Tabak *Spacer* und einer Stimulation der Amplifikation und Expression heterologer benachbarter Gene beobachtet. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *A. thaliana* rDNA *SalI* *Spacer* rief dagegen in den Transformanten GUS 1x rDNA keine Amplifikation des benachbarten GUS-Reportergens hervor. Auch die Expression des benachbarten Transgens blieb unbeeinflusst.

Die einheitliche GUS-Expression der im Rahmen dieser Arbeit analysierten 26 Transformanten ist zudem unbeeinflusst von der Position der integrierten T-DNA (vergl. Abb. 3.7). Dies deutet darauf hin, daß ein Effekt der chromosomalen Umgebung auf die Reporterogenaktivität in *A. thaliana* T-DNA Transformanten vernachlässigbar gering ist. Einen weiteren Hinweis auf die untergeordnete Rolle des Positionseffektes bei T-DNA Transformanten in *A. thaliana* geben Reporterogen-Expressionsanalysen von Transformanten, deren T-DNAs in oder in der Nähe eines repetitiven Elementes integriert vorliegt (vergl. Tabelle 3.9 und Kap. 3.3). Für diese Transformanten wurde eine ähnlich hohe Reporterogenaktivität wie für transgene Linien mit dem gleichen Reportergen nachgewiesen, in denen die T-DNA in anderen Genompositionen integriert war.

4.3.2 Die GUS-Aktivität der für die T-DNA der Reportergenkassette *GUS 1xr repeat* hemizygoten Transformanten ist im Vergleich zu homozygoten um die Hälfte reduziert

Die Gegenüberstellung der GUS-Aktivitäts-Mittelwerte der für die T-DNA homozygoten Transformanten *GUS 1xr repeat* und der hemizygoten Linien ergab, daß homozygote Pflanzen eine ca. doppelt so hohe GUS-Aktivität aufwiesen wie hemizygoten (vergl. Tab. 3.12 und 3.13). Damit trug jede Reportergenkopie in gleichem Maße zur Genexpression bei. Daher kann von einem additiven Dosisseffekt ausgegangen werden, wie er z.B. auch in einer Studie von Hobbs *et al.* (1993) beschrieben wurde.

Die Verringerung der GUS-Aktivitäten, die für fünf Wochen alte homo- und hemizygoten *GUS 1xr repeat* Transformanten im Vergleich zu zwei und acht Wochen alten Pflanzen beobachtet wurde, ist vermutlich auf Veränderung der Wachstumsbedingungen zurückzuführen. Nach zweiwöchigem Wachstum in axenischer Kultur unter Langtagbedingungen wurden die Pflanzen in Erde gesetzt und Kurztagbedingungen ausgesetzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen anhand einer großen Anzahl transgener Pflanzen eine einheitliche hohe und über mehrere Generationen stabile GUS-Aktivität und einen additiven Dosisseffekt. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien an einer geringeren Anzahl an Transformanten, die eine Kopie des GUS-Gens in der T-DNA aufwiesen (B. Lechtenberg, 1999, D. Schubert, 1999, M. Gils, 2000). Diese Ergebnisse widersprechen jedoch früheren Untersuchungen in *Arabidopsis*, Tabak und *Petunia*, die eine starke Variabilität zwischen einzelnen Transformanten eines Transformationsexperiments beschrieben (z.B. Jones *et al.*, 1985, Nagy *et al.*, 1985, Czernilofsky *et al.*, 1986, Lawton *et al.*, 1987, Odell *et al.*, 1987, Dean *et al.*, 1988, Williamson *et al.*, 1989, Holtorf *et al.*, 1995, Meza, *et al.*, 2001). Holtorf *et al.* (1995) ermittelte in *Arabidopsis* anhand 22 transgener Pflanzen, die mit einer CaMV 35S GUS-Reportergenkassette transformiert worden waren, starke Variabilitäten in der Reportergenexpression zwischen einzelnen Transformanten. Die transgenen Pflanzen wiesen

GUS-Aktivitäten auf, die sich maximal um einen Faktor von 2500 unterschieden. In diesen Studien wurde jedoch entweder keine oder nur eine ungenaue Analyse der T-DNA Kopienzahl durchgeführt, während die hier gezeigten Daten ausschließlich für Einzelkopie-Transformanten erarbeitet wurden. Daher lassen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen den Schluß zu, daß eine stabile und einheitlich hohe Expression von Transgen in *Arabidopsis thaliana* an das Vorliegen von T-DNAs in Einzelkopie geknüpft ist.

Die Unterschiede zu früheren Studien lassen sich jedoch nicht ausschließlich auf eine fehlende oder ungenaue Analyse der T-DNA Kopienzahl zurückführen, da andere Spezies wie *Petunia* und Tabak im Vergleich zu *A. thaliana* größere Genome mit einem höheren Anteil an repetitiver DNA besitzen. Daher kann die Möglichkeit bestehen, daß die chromosomale Umgebung einer T-DNA Integration in anderen Pflanzenspezies, im Gegensatz zu den vorgestellten Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana*, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Reporterexpression spielen kann.

4.3.3 Untersuchungen der Silencing-Phänomene von *A. thaliana* Transformanten, die mehr als zwei Kopien des GUS-Reportergens besitzen

In vorherigen Studien zur Transgen-Expression in *A. thaliana* wurde festgestellt, daß transgene Linien, die drei oder mehr Kopien des β -Glucuronidasegens trugen, eine stark reduzierte GUS-Expression aufwiesen (B. Lechtenberg, 1999, D. Schubert, 1999, M. Gils, 2000).

Hemizygoten Pflanzen, deren T-DNA die GUS-Reportergenkassette in zweifacher Kopie (GUS 2x) enthielt, besaßen eine zu homozygoten GUS 1x T-DNA Linien vergleichbar hohe und einheitliche Aktivität. Homozygote Pflanzen, deren T-DNA das Konstrukt GUS 2x trug, zeigten eine variable GUS-Expression, wobei einige Pflanzen hohe und andere niedrige Enzymaktivität aufwiesen. Enthielten die transgenen Pflanzen in ihrer T-DNA drei Kopien der GUS-Reportergenkassette (GUS 3x), wurde in den homozygoten und hemizygoten Pflanzen eine im Vergleich zu GUS 1x T-DNA Linien 1000fache Verringerung der GUS-Aktivität beobachtet. Weiterhin konnte für Pflanzen, die drei oder mehr Kopien des GUS-Reportergens trugen, ein Abfall der Expression im Verlauf der Entwicklung ermittelt werden. PTGS wurde als Mechanismus dieser Reporterexpressionreduktion vorgeschlagen (D. Schubert, 1999, M. Gils, 2000).

Zur Erklärung von PTGS in Pflanzen wurden mehrere Modelle vorgeschlagen. Einerseits wurde eine direkte DNA-DNA Wechselwirkung postuliert, bei welcher homologe Sequenzbereiche paaren (zusammengefaßt in Selker, 1997, 1999), andererseits wurde vermutet, daß das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes an mRNA, zum Abbau der Transgen-mRNA führt („Threshold“-Hypothese, Lindbo *et al.*, 1993, Dehio und Schell, 1994, Que *et al.*, 1997).

Zur Klärung der Frage, ob DNA-DNA Wechselwirkung durch homologe Sequenzbereiche eine Rolle spielt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit Transformanten durchgeführt, die promotorlose GUS-Reportergene aufwiesen. Kreuzungen solcher Pflanzen wurden mit

Transformanten durchgeführt, deren T-DNAs ein, zwei oder drei Kopien des GUS-Gens (GUS 1x, GUS 2x und GUS 3x) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthielten (D. Schubert, 1999, M. Gils, 2000). Den Untersuchungen der Genexpression in der F1 Nachkommenschaft wurden Daten gegenübergestellt, die mit Hilfe transgener Pflanzen gewonnen wurden, die GUS-Gene in verschiedener Anzahl unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthielten. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die ermittelte GUS-Aktivitätshöhe lediglich von der Anzahl der Reporterengkassetten mit Promotor abhing (s. 3.3.1.6). Gleiches galt für Transformanten, deren T-DNA 35S::GUS::ocs3' und GUS::ocs3' Reporterengkassetten enthielten. Diese Ergebnisse sind konform mit Studien von Waterhouse *et al.*, 1998 und Wang *et al.*, 1998, die ebenfalls keine Veränderung der GUS-Aktivität durch die Anwesenheit promotorloser GUS-Reportergene in transgenen Tabak- bzw. Reispflanzen zeigen konnten. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß das Modell der DNA-DNA Wechselwirkung homologer Sequenzbereiche zur Auslösung von PTGS für *A. thaliana* Transformanten mit drei oder mehr Kopien des GUS-Reportergens keine Anwendung findet. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, daß in einer vorausgegangenen Studie ermittelt werden konnte, daß die Einführung zusätzlicher, homologer Promotorsequenzen ebenfalls nicht zu einer Reduktion der Transgenexpression führen (B. Lechtenberg, 1999). Dies deutet darauf hin, daß in transgenen *Arabidopsis*-pflanzen mit drei oder mehr Kopien des GUS-Reportergens das Erreichen eines Schwellenwertes der Transkriptmenge die Induktion von Gen-Silencing hervorruft („*Threshold-Hypothese*“, Lindbo *et al.*, 1993, Dehio und Schell, 1994, Metzloff *et al.*, 1997, Que *et al.*, 1997, Elmayan *et al.*, 1998).

4.3.4 Expressionsstudien des GFP (*green fluorescent protein*) Reportergens in *A. thaliana*

Um vergleichbare und allgemeine Aussagen über die Regulation von Reportergenen in *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, ist es von Bedeutung, die Expression mehrerer Reportergene zu untersuchen. Dadurch soll ausgeschlossen werden, daß es sich bei den beobachteten Prozessen um Vorgänge handelt, die lediglich für ein bestimmtes Transgen spezifisch sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 8 Transformanten etabliert, die eine intakte Kopie des GFP-Reportergens trugen. Im Vergleich der GFP 1x Transformanten wurde deutlich, daß die ermittelten relativen Fluoreszenzen und Expressionen nur geringfügig voneinander abwichen. Die Orientierung der Reporterengkassette relativ zur T-DNA hatte keinen Einfluß auf die Expression des Reportergens (vergl. Abb. 3.26 und 3.28). Positionseffekte scheinen keine Rolle zu spielen (s.o.), da die Reportergene an verschiedenen Orten im *A. thaliana* Genom integriert sind (vergl. Abb. 3.7).

Wie unter 3.3.2.2 aufgeführt, wiesen die für die T-DNA hemizygoten Pflanzen der Transformanten GFP 1x eine im Vergleich zur Expression homozygoter Transformanten um die

Hälfte reduzierte Reporterogenaktivität auf. Diese positive Korrelation zwischen ein- bzw. zweifacher Kopienzahl der GFP-Reportergenkassetten und der Reportergenexpression ist vergleichbar zu der, die für das GUS-Reportergen beobachtet wurde (diese Arbeit, D. Schubert, 1999, M. Gils, 2000). Auch für das GFP-Transgen konnte der Vergleich homo- und hemizygoter Pflanzen einen additiven Gendosisseffekt nachweisen.

4.3.5 Expressionsstudien von Transformanten, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus aufweisen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Transformanten identifiziert werden, die zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus aufwiesen und folglich homozygot jeweils vier Reportergenkassetten enthielten. Die Transformante GUS 1xr rDNA 101 enthält vier GUS-Reportergenkassetten und die Transformante mGFP 1xr 127 enthält vier GFP-Reportergenkassetten (vergl. Abb. 3.3).

Für die homozygote Linie GUS 1xr rDNA 101 konnte eine uneinheitliche GUS-Aktivität in der Nachkommenschaft mit hoch- und niedrigexpmierenden Pflanzen ermittelt werden. Die Expression nahm im Verlauf der Entwicklung ab. Die hemizygoten Pflanzen wiesen dagegen eine hohe und einheitliche GUS-Aktivität auf. Diese entsprach der Aktivität, die in den GUS 1x und GUS 1xr *repeat* Transformanten ermittelt wurde (vergl. 3.3.1.5). Diese Ergebnisse wurden auch in weiteren Transformanten beobachtet (SPT/GUS f 102, B. Lechtenberg, 1999, GUS 1xf 57, M. Gils, 2000). Auch in diesen Fällen lagen die T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus vor (B. Lechtenberg, unveröffentlicht).

In einer Studie von D. Schubert (1999) wurden Transformanten untersucht, deren T-DNAs zwei GUS-Reportergenkassetten enthalten. Die dort ermittelten GUS-Aktivitäten der für die T-DNA homozygoten und hemizygoten Pflanzen sind mit den Aktivitäten der T-DNA Linie GUS 1xr rDNA 101 konform. Folglich ist die Reduktion der GUS-Aktivität in der für die T-DNA homozygoten GUS 1xr rDNA 101 Transformante nur durch die Erhöhung der Reportergenkopienzahl bedingt. F1 Nachkommen der Kreuzung der Transformante GUS 1xr rDNA 101 und GUS 1x Transformanten enthielten drei GUS-Reportergene und eine vergleichbare GUS-Aktivität wie die für die T-DNA hemizygoten GUS 3x Transformanten (drei GUS Reporter gene). Konforme Ergebnisse wurden in der Bestimmung der GUS-Aktivität der F1 Nachkommenschaft von Kreuzungen zwischen GUS 1x und GUS 2x Transformanten erhalten (D. Schubert, unveröffentlicht). Die Ergebnisse einer Inaktivierung von Transgenen durch das Vorliegen mehrerer Kopien stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen, die dieses Phänomen in Einzelfällen beobachteten (z.B. Linn *et al.*, 1990, zusammengefaßt in Jorgensen, 1990, Flavell, 1994).

Für die homozygote mGFP 1xr 127 Transformante konnte eine eindeutig höhere relative GFP Fluoreszenz und GFP Expression im Vergleich zu anderen für die T-DNA homozygoten mGFP

1x Transformanten ermittelt werden. Die relative Fluoreszenz und GFP Expression der hemizygoten mGFP 1xr 127 Pflanzen entsprach der für die T-DNA GFP 1x homozygoten Transformanten (vergl. 3.3.2.3). Damit konnte für transgene Linien mit GFP Reportergenen unter der Kontrolle des 35S CaMV Promotors ein additiver Gendosisseffekt nachgewiesen werden.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Transgenexpression von Transformanten, die T-DNAs in invertierter Orientierung enthalten, ausschließlich durch die Kopienzahl des Reportergens bedingt war. Die Orientierung der Reportergenkassetten zueinander hatte dagegen keinen Einfluß auf die Reporteraktivität. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Studien, die für Reportergene in invertiert vorliegenden T-DNAs ausgeprägtes Silencing beobachteten (Stam *et al.*, 1997, 1998, 2000).

Northern Blot Analysen von homozygoten SPT 1x und SPT 2x Transformanten (vergl. M. Gils, 2000) ergaben ebenfalls keine Expressionsreduktion durch die Erhöhung der SPT Reportergenkopienzahl von zwei auf vier. Das Vorliegen von zwei T-DNAs in invertierter Orientierung an einem Locus konnte für die Transformante SPT 1xr 83 mittels iPCR Analysen im Verlauf dieser Arbeit nachgewiesen und durch Southern Blot Analysen (D. Schubert, unveröffentlicht) bestätigt werden.

Dies deutet darauf hin, daß in *A. thaliana* unterschiedliche Korrelationen für das Reportergen GUS und für die Reportergene GFP und SPT zwischen der Reportergenkopienzahl und der beobachteten Expression bestehen. Die Erhöhung der Reportergenkopienzahl von zwei auf vier bewirkt für das GUS-Reportergen eine Verringerung der GUS-Expression. Für das GFP-Reportergen bewirkt die Erhöhung der Reportergenkopienzahl von zwei auf vier die Erhöhung der Expression und beinhaltet daher einen additiven Gendosisseffekt. Für SPT-Reportergene konnte ebenfalls kein Silencing durch die Erhöhung der Kopienzahl von zwei auf vier nachgewiesen werden (M. Gils, 2000).

Die beobachteten Unterschiede des Einflusses der Transgen-Kopienzahl auf das Expressionsmuster von GUS-, GFP- und SPT-Reportergenkassetten könnten durch die Zusammensetzung der kodierenden Sequenz begründet sein, da der einzige Unterschied in diesen Bereichen zu finden ist. Diese unterscheiden sich durch den GC-Gehalt und die Länge der Transkripte. Denkbar wäre auch ein Einfluß spezifischer Sequenzbereiche auf die Regulation der Transgen-Expression.

4.3.6 Studien zur *antisense* Suppression in *A. thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in transgenen Pflanzen mittels GUS-Aktivitätstests und Northern Blot Analysen der Zusammenhang zwischen der Einführung eines GUS-Reportergens in *antisense* Orientierung und einer Genreduktion von GUS-Reportergenen in *sense* Orientierung nachgewiesen werden.

Für Transformanten, deren T-DNAs 35S::GUS::ocs3' und 35S::GUS-AS::ocs3' Reporterengkassetten (GUS S/AS f) enthielten, konnte im Vergleich zu GUS 1x Transformanten eine bis zu 2000fache Verringerung der GUS-Aktivität nachgewiesen werden (vergl. Abb. 3.21 und 3.22). Gleiches galt für die F1 Nachkommen der Kreuzungen einer Transformante, deren T-DNA eine 35S::GUS-AS::ocs3' Reporterengkassette trug, und Transformanten, deren T-DNA ein, zwei bzw. drei 35S::GUS::ocs3' Reporterengkassetten enthielten (vergl. Abb. 3.23 und 3.24). Die Expressionsreduktion der F1 Kreuzungsnachkommen durch die Einführung eines GUS-Reporterengens in *antisense* Orientierung, ist folglich unabhängig von der Zahl der GUS-Reporterengene in *antisense/sense* Orientierung und von dem Vorliegen der *sense* bzw. *antisense* GUS-Reporterengene in *cis* oder *trans*. Im Vergleich zu homozygoten GUS 1x *sense* Transformanten war die Expression in homozygoten Transformanten, die eine Kopie der Reporterengkassette 35S::GUS AS::ocs3' trugen, deutlich reduziert (vergl. Abb. 3.25). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die *antisense* Moleküle nicht in stöchiometrischer Menge vorliegen müssen, um die Suppression der *sense* Gene zu bewirken.

In zwei Wochen alten Pflanzen konnte im Vergleich zu Transformanten, deren T-DNAs drei GUS-Reporterengkopien in *sense* Genorientierung erhalten, sowohl für die GUS S/AS f Transformanten als auch für die F1 Kreuzungsnachkommen eine drastische Reduktion der GUS-Aktivität ermittelt werden. Die Inaktivierung der GUS-Transgene der GUS 3x Transformanten erfolgte im Verlauf der Entwicklung, welches zu einem sukzessiven Abfall der Reporterengaktivität führt. In acht Wochen alten Pflanzen konnte jedoch nur noch ein geringfügiger Unterschied zwischen der GUS-Aktivität der GUS 3x Transformanten und den GUS S/AS f Transformanten bzw. der F1 Kreuzungsnachkommen ermittelt werden. *Antisense* Suppression zeigt daher einen wesentlich früheren Zeitpunkt der Reporterenginaktivierung als PTGS.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals systematisch, daß die *antisense* Suppression im Vergleich zum PTGS der GUS 3x *sense* Transformanten einen früheren Zeitpunkt der Inaktivierung aufweist. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen, die anhand phänotypischer Analysen der Blüten in *Petunia* (Jorgensen *et al.*, 1996, Que *et al.*, 1998, Stam *et al.*, 2000) stärkere *antisense* Suppression in *antisense Chs* Transformanten als PTGS in *sense Chs* Transformanten ermitteln konnten. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Studien des GUS-Reporterengens in Tabak und Reis erhalten (Waterhouse *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000).

Zur Erklärung der *antisense* Suppression wurde angenommen, daß es zur RNA-RNA Interaktion im Cytoplasma kommt, die dann durch doppelstrangspezifische RNasen abgebaut wird. Eine koordinierte Eliminierung von *sense*- und *antisense*-RNAs wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen (Hall *et al.*, 1993, Hamilton *et al.*, 1990, Sheedy *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1988).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden Untersuchungen zur T-DNA Integration und der Regulation der Transgenexpression in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

Für eine große Zahl von T-DNA-Einzelkopie Pflanzen konnte die T-DNA Integration detailliert charakterisiert werden. Die Analyse ergab, daß in den meisten Fällen kleinere Deletionen der Bordersequenzen und der angrenzenden T-DNA Bereiche vorlagen. Dies galt sowohl für die Sequenzen in den linken wie auch den rechten T-DNA Borderregionen. Ebenso wurden in fast allen untersuchten transgenen Linien Deletionen, die bis zu 960 bp umfaßten, innerhalb der Integrationsstellen des Pflanzengenoms nachgewiesen. In den Verbindungsbereichen zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA waren in der Regel zusätzliche kurze Sequenzen unbekannter Herkunft inseriert. Die Kartierung der T-DNA Integrationsorte ergab eine Verteilung entlang der Chromosomen, dabei lagen 30% der Insertionen in Genen vor. T-DNA Integrationen in repetitiven Sequenzen wurden in lediglich 3% der studierten Linien nachgewiesen, damit konnte eine klare Insertionspräferenz der T-DNA in nicht-repetitive Genombereiche belegt werden.

Die Expressionsanalysen ergaben für 34 transgene Linien, die entweder zwei Kopien des GFP (*green fluorescent protein*) Reportergens oder des β -Glucuronidasegens (GUS) unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors trugen, eine einheitlich hohe und über mehrere Generationen stabile Expression. Die für die T-DNA hemizygoten Linien zeigten im Vergleich zu homozygoten Pflanzen eine um 50% reduzierte Expression. Es konnte daher für beide Reportergene ein additiver Gendosisseffekt in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nachgewiesen werden. Die einheitlich hohe und stabile GUS-Reportergenexpression war unbeeinflusst von der Präsenz unterschiedlicher repetitiver Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft der Transgene. Ein bedeutender Einfluß der chromosomalen Umgebung auf die Reportergenexpression konnte ebenso weitgehend ausgeschlossen werden, da Transformanten, deren T-DNAs in unterschiedlichen Positionen im Genom vorlagen, eine vergleichbar hohe Reportergenexpression aufwiesen.

Frühere Untersuchungen zeigten, daß es beim Vorliegen von drei oder mehr GUS-Reportergenen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors im *Arabidopsis*genom zu post-transkriptionellem Silencing (PTGS) kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Präsenz von homologen kodierenden, nicht-transkribierten Sequenzen kein Silencing auslöst. Daher kann ein Modell unterstützt werden, welches postuliert, daß eine hohe Transkriptmenge den Abbau der mRNA initiiert. Das Studium der *antisense* Suppression ergab, daß ein GUS-*antisense*-Reportergen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors eine geringere Transkriptmenge aufwies als ein vergleichbares *sense* Transgen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Kopie eines *antisense* Transgens mehrere *sense* Reportergene supprimiert. In allen Fällen wurde eine einheitlich niedrige Expression nachgewiesen, die vergleichbar hoch war wie beim PTGS von *sense* GUS-Genen.

6 Literaturverzeichnis

Allen, G.C., Hall, G., Michalowsky, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A.K. und Thompson, W.F. (1996) High-level transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* **8**: 899-913

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol. Biol.* **215**: 403-410

Ambros, P.F., Matzke, A.J.M. und Matzke, M.A. (1986) Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromomes by *in situ* hybridization. *EMBO J.* **5**:2073-2077

An, G. (1986) Development of plant promotor expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promotor in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* **81**: 86-91

An. Y., McDowell, S. Huang, E., McKinney, E., Chambliss, S. und Meagher, F. (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* **10**: 107-121

Anadalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R. Smith, T.H. und Vance, V.B. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13079-13084

Anadalakshmi, 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**: 142-144

Assaad, F.F., Tucker, K.L. und Signer, E.R. (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **22**: 1062-1085

Azpiroz-Leehan, R. und Feldmann, K.A. (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *TIG* **13**: 152-156

Baker, B., Coupland, G., Federoff, N., Starlinger, P. und Schell, J. (1987) Phenotypic assay for excision of the maize controlling element *Ac* in tobacco. *EMBO J.* **6**: 1547-1554

Baulcombe, D.C. (1996) RNA as a target and initiator of post-transcriptional gene silencing in 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**: 1194-1199

Beelin, C., Berthome, R., Palauqui, J.-C., Tepfer, M. und Vaucheret, H. (1998) Infection of tobacco of *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silence of nonviral (Trans)genes. *Virology* **252**: 313-317

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**: 725-734

Borisjuk, N., Borisjuk, L., Komarnytsky, S., Timeva, S., Hemleben, V., Gleba, Y. und Raskin, I. (2000) Tobacco ribosomal DNA spacer element stimulates amplification and expression of heterologous genes. *Nature Biotechnology* **18**: 1303-1306

Bourque, J.E. (1995) Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci.* **105**: 125-149

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. und Vaucheret, H.** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* **17**: 6739-6746
- Brink, R.A.** (1956) A genetic change associated with the R-locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* **41**: 872-889
- Cameron, F.H. und Jennings, P.A.** (1991) Inhibition of gene expression by a short sense fragment. *Nuc. Acids Res.* **19**: 469-474
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C.** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- Chuang, C.F. und Meyerowitz, E.M.** (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **9**: 4985-4990
- Chyi, Y.S., Jorgensen, R.A., Goldstein, D., Tanksley, S.D. und Loaiza-Figueroa, F.** (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 64-69
- Coates, D., Taliercio, E.W. und Gelvin, S.B.** (1987) Chromatin structure of integrated T-DNA in crown gall tumors. *Plant Mol. Biol.* **8**: 159-168
- Cogoni, C. und Macioni, G.** (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **339**: 166-169
- Czernilofsky, A.P., Hain, R., Baker, B. und Wirtz, U.** (1986) Studies of the structure and functional organization of foreign DNA integrated into the genome of *Nicotiana tabacum*. *DNA* **5**: 473-482
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. und Baulcombe, D.C.** (2000) A RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for postranskriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553
- 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**: 2869-2880
- Dean, C., Jones, J., Favreu, M., Dunsmuir, P. und Bedbrook, J.** (1988) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nuc. Acids Res.* **16**: 9267-9283.
- de Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., van Montagu, M., Inze, D., Castresana, C.** (1992) Suppression of beta-1,3glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* **11**: 2595-2601
- Dehio, C. und Schell, J.** (1994) Identification of plant genetic loci involved in a postranskriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 5538-5542
- Dellaporta, S.L., Wood, J. und Hicks, J.B.** (1983) A plant DNA miniprep: version 11. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. und Depicker, A.** (1997) T-DNA integration pattern in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J.* **11**: 15-29

- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. und Goodman, H.M.** (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**: 561-573
- Depicker, A. und Van Montagu, M.** (1997) Post transcriptional gene silencing in plants. *Plant J.* **16**: 651-659
- Deroles, S.C. und Gardner, R.C.** (1988) Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **11**: 365-377
- Dieguez, M.J., Vaucheret, H., Paszkowski, J. und Mittelsten Scheid, O.** (1998) Cytosin methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but is required for its maintenance. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 207-215
- Donaldson, K.M. und Karpen, G.H.** (1997) Trans-suppression of terminal-deficiency-associated position-effect variegation in a *Drosophila* minichromosome. *Genetics* **145**: 323-337
- 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., Vineentz, F.M., Chupeau, Y. und Vaucheret, H.** (1994) Cosuppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 613-621
- Dürrenberger, F. Cramer, A., Hohn, B. und Koukolíková-Nicola, Z.** (1989) Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9154-9158
- Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S.A., Ribak, O., Dixon, R.A. und Lamb, C.J.** (1999) Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine-ammonia-lyase gene. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 9057-9061
- Elmayan, T., Balzergue, S., Beon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guenet, Y., Mourrain, P., Palauqui, J.C., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikoff, K. und Vaucheret, H.** (1990) Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* **10**: 1747-1758
- Elmayan, T. und Vaucheret, H.** (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced posttranscriptionally. *Plant J.* **9**: 787-797
- English, J.J., MueRer, E. und Baulcombe, D.C.** (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**: 179-188
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-267
- Finnegan, J. und MeElroy, D.** (1994) Transgene inactivation: plants fight back! **12**: 883-888
- Finnegan, J., Genger, R.X., Peakok, W.J. und Dennis, E.S.** (1998) DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **49**: 223-247
- Fumer, I.J., Sheikh, M.A. und Collet, C.E.** (1998) Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: Genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* **149**: 651-662
- Gheysen, G., Villarroel, R. und van Montagu, M.** (1991) Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* **5**: 287-297

- Gheysen, G. Herman, L., Breyne, P., Gielen, J., van Montagu, M. und Depicker, A.** (1990) Cloning und sequence analysis of truncated T-DNA inserts of *Nicotiana tabacum*. *Gene* **94**: 155-163
- Gheysen, G., van Montagu, M. und Zambryski, P.** (1987) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6169-6173
- Gielen, J.M., De Beuckeleer, 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**: 835-846
- Goodwin, J, Capman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A. und Dougherty, W.G.** (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* **8**:95-105
- Goring, D.R., Thomson, L. und Rothstein, S.J.** (1991) Transformation of a partial nopaline synthase gene into tobacco suppresses the expression of resident wild-type gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:1770-1774
- Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K. und Schweizer, D.** (1991) rDNA Intergenic Region from *Arabidopsis thaliana*, structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *J. Mol. Biol.* **221**: 1209-1222
- Hall, L.N., Tucker, G.A., Smith, C.J.S., Watson, C.F., Seymour, G.B., Bundick, Y., Boniwell, J.M., Flechter, J.D., Ray, J.A., Schuch, W., Bird, C.R. und Grierson, D.** (1993) Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant J.* **3**: 121-129
- Hamilton, A J., Brown, S., Yuanhai, H., Ishizuda, M., Lowe, A., Alpuche Solis, A.-G. und Grierson, D.** (1998) A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppressed of ACC-oxidase Gene.
- Hamilton, A.J. und Bauleombe, D.C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* **166**: 557-580
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. und Hoge, S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2122-2127
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. und Kumashiro, T.** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* **6**(2): 271-282
- Henikoff, S.** (1997) Nuclear organization and gene expression: homologous pairing and long range interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 3 88-3 95
- Henikoff, S. und Comai, L.** (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* **149**: 307-318
- Hobbs, S., Kpodar, P. und DeLong, C.M.0.** (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* **15**: 851-864

- Hobbs, S., Warkentin, T. und DeLong, C.M.O.** (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* **21**: 17-26
- Hoefgen, R. und Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9877
- Hoekema, A., Hirsch, P.R. und Hooykaas, P.J.J.** (1983) A binary plant vector based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-Plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- Hohn, B., Zdena, K.N., Bakkeren, G. und Grimsley, N.** (1989) *Agrobacterium*-mediated gene transfer in monocots and dicots. *Genome* **31**: 987-993
- Holtorf, S., Apel, K. and Bohlmann, H.** (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 637-646
- Holtdorf, S.** (1999) Stochastic and nonstochastic post-transcriptional silencing of chitinase and β -1,3-glucanase genes involves increase RNA turnover-possible role for ribosome-independent RNA degradation. *Plant Cell* **11**: 471-483
- Howard, E. und Citovsky, V.** (1990) The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. *Bioassays* **12**:103-108
- Iglesias, V.A., Mosckone, E.A., Papp, F., Neuhuber, I., Michalowski, S., Phelan, T., Spiker, S., Matzke, M., und Matzke, A.J.M.** (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* **9**: 1251-1264
- Jacobs, J.J., Litiere, M.R., van Dijk, V., van Eldik, J., Van Montagu und Cornelissen, M.** (1997) Post-transcriptional β -glucanase gene silencing involves increasing transcript turnover that is translational independent. *Plant J.* **12**: 885-893
- Jakowitsch, J., Papp, L, Moscone, E.A., van der Winden, J., Matzke, M. und Matzke, A.J.** (1999) Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J.* **17**: 131-140
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. und Bevan, M.V.** (1987) GUS-fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- Jones, J.D.G., 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 excisions in transgenic plants. *Transgenic Res.* **1**: 285-297
- Jones, J.D.G., Dunsmuir, P. und Bedbrook, J.** (1985) High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.* **4**: 2411-2418
- Jorgensen, R.A.** (1995) Cosuppression, flower control patterns and metastable gene expression states. *Science* **268**: 686-691
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q. und Napoli, C.A.** (1990) 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**: 957-973
- Jorgensen, R.A., Snyder, C. und Jones, J.D.G.** (1997) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* **207**:478-485

- Jorgensen, R.A., Atkinson, R.G., Forster, R.L., Lucas, W.J.** (1998): A RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**: 1486-1487
- Karpen, G.H.** (1994) Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 281-291
- Kassehau, K.D. und Carrington, J.C.F** (1998) A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional silencing. *Cell* **95**: 461-470
- Klee, H.J.; Horsch, R.B.; Hinchee, M.A.; Hein, M.B. und Hoffmann, N.L.** (1987) The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes & Development* **1**: 86-96
- Konez, C., Martini, N., Meyerhofer, R., Konez-Kahlman, Z., Korber, H., Redei, G.P. und Schell, J.** (1989) High frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*: **86**: 8467-8471
- Konez, C., Mmeth, G.P., Redei, G.P. und Schell, J.** (1994) Homology recognition during T-DNA integration into the plant genome. In: *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants* (Paszkowsky, J. Ed.), Kluwers: 167-189
- Kooter, J.M. und Mol, J.N.M.** (1993) Trans-Inactivation of gene expression in plants. *Curr. Biol.* **4**: 371-378
- Kunz, C., Schöb, H., Stam, M., Kooter, J.M. und Meins, F.** (1996) Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase genes. *Plant J.* **10**: 437-450
- Laufs, P., Autran, D. und Traas, J.** (1999) A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in Arabidopsis. *The Plant J.* **18**(2): 131-139
- Lawton, M.A., Tierney, M.A., Nakamura, I., Anderson, E., Komeda, Y., Debu, P., Hoffman, N., Fraley, R.T. und Beachy, R.N.** (1987) Expression of soybean β -Conglycinin gene under control of the cauliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues. *Plant Mol. Biol.* **9**: 315-324
- Lechtenberg, B.** (1999) Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Leutwiler, L.S., Hough-Evans, B.R. und Meyerowitz, E.M.** (1984) The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 15-23
- 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**: 1749-1759
- Linn, F., Heidmann, I., Saedler, H. und Meyer, P.** (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize Al gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* (1990) **222**: 329-336
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. und Whittier, R.F.** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**(3): 457-463
- Luff, B., Pawlowski, L. und Bender, J.** (1999) An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in Arabidopsis. *Mol. Cell* **3**: 501-511

- 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
- Maluszynska, J. und Heslop-Harrison, J.S.** (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **1**: 159-166
- Martensen, R.** (1998) Chromosomal imprinting in plants. *Current opinion in genetics & development* **8**: 240-244
- Martin-Morris, L.E., Csink, A.K., Dorer, D.R., Talbert, P.B. und Henikoff, S.** (1997) Heterochromatic trans-inactivation of *Drosophila* white transgenes. *Genetics* **147**: 671-677
- Matsumo, I., Ito, Y., Hosoi, T., Takahashi, Y. und Machida, Y.** (1990) Integration of *Agrobacterium* T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA und plant DNA. *Gen. Genet.* **224**: 309-316
- 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 pUB 110. *J. Bacteriol.* **160**: 413-420
- Matzke, M.A., Priming, M., Trnovsky, J. und Matzke, A.J.M.** (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* **8**: 643-649
- Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M.** (1990) Gene interactions and epigenetic variation in transgenic plants. *Dev. Genet.* **11**: 214-223
- Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M.** (1991) Differential inactivation and methylation of a transgene in plants by two suppressor loci containing homologous sequences. *Plant Mol. Biol.* **16**: 821-830
- Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M.** (1993) A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 379-386
- Matzke, A.J., Neuhuber, F., Park, Y.D., Ambros, P.F. und Matzke, M.A.** (1994) Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 219-229; *Erratum Mol. Gen. Genet.* (1995) **247**: 264
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B. und Koncz, C.** (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO J.* **10**(3): 697-704
- Mengiste, T., Amedeo, P. und Paszkowski, J.** (1997) High-efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* with a selectable marker gene regulated by the T-DNA p' promoter. *Plant J.* **12**: 945-948
- Mette, M.F., Van der Winden, J., Matzke, J. und Matzke, A.J.M.** (1999) Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *Plant J.* **18**: 241-248
- Metzlaff, M., O' Dell, M., Cluster, P.D. und Flavell, R.B.** (1997) RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in Petunia. *Plant J.* **4**: 89-100
- Meyer, P.** (1999) The role of chromatin remodelling in transgene silencing and plant development. *In vitro Cell Dev. Biol. Plants* **35**: 29-36

- Meyerowitz, E.M. und Somerville, C.R.** (1987) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 21-36
- Meyerowitz, E.M.** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* **56**: 263-269
- Meza, T.J., Kamfjord, D., Hakelien, A.M., Evans, I., Godager, L.H., Mandal, A., Jakobsen, K.S. und Aalen, R.B.** (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings und can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research* **10**: 53-67
- Mittelsten Scheid, O., Paszkowsky, J. and Potrykus, I.** (1991) Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 104-112
- Mittelsten Scheid, O., Afsar, K. and Paszkowski, J.** (1998) Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 632-637
- Mourrain, P., Bélin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Ré moué, K., Sanial, M., Vo, T.A. und Vaucheret, H.** (2000) *Arabidopsis* SGS2 und SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing und natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Murata, M. und Motoyoshi, F.** (1995) Floral chromosomes of *Arabidopsis thaliana* for detecting low-copy DNA sequences by fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma* **104**: 39-43
- Nagy, F., Odell J.T., Morelli, G., Chua, N.-H.** (1985) Properties of expression of the 35S Promoter from CaMV in transgenic tobacco plants. In: Zeitling, M., Hollaender, A. (Editoren) *Biotechnology in Plant science*. Academic Press, Inc, London
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase in petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289
- Ochman, H., Gerber, A.S. und Hartl, D.L.** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623
- 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**: 810-812
- Odell, J.T., Nagy, F. und Chua, N.-H.** (1987) Variability in 35S Promoter expression between independent transformants. In: Key, J., McIntosh, L. (Editoren) *Plant gene systems and their Biology* Vol 62., Alan Liss, New York
- Ohba, T., Yoshioka, Y., Machida, C. und Machida Y.** (1995) DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *The Plant J.* **7**(1), 157-164
- 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**: 4738-4745; *Erratum EMBO J.* (1998) **17**: 2137
- Pansegrau, W. und Lanka, E.** (1991) Common sequence motifs in DNA relaxes and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucl. Acids Research* **19**: 3455

- 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**: 183-184
- 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**: 465-475
- Pruitt, R.E. und Meyerowitz, E.M.** (1986) Characterisation of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **187**: 169-184
- Que, Q., Wang, H.-Y., English, J. and 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**: 1357-1368
- Que, Q., Wang, H.Y. und Jorgensen, R.** (1998) Distinct patterns of pigment suppression are produced by allelic *sense* and *antisense* chalcone synthase transgenes in *petunia* flowers. *Plant J.* **13(3)**: 401-409
- Ratcliff, F., Hamilton, B.D. und Baulcombe, D.C.** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-1560
- Reuter, G. und Spierer, P.** (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* **14**: 605-612
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. und Baulcombe, D.C.** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946
- Saenger, C.** (1996) The possible links between RNA-directed DNA methylation (RdDM, *sense* and *antisense* RNA, gene silencing, symptom-induction upon microbial infections and RNA-directed polymerase (RdRP). In: *Biology of Plant-Microbe Interactions* (Stacey, G., Mullin, B. und Gresshoff, P.M., Ed.), International society for molecular plant-microbe interactions, Knoxville, USA
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1-5
- 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**: 2087-2101
- Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurink, J., Silva, B., Van Vliet, F. und Villaroel, R.** (1979) Interactions and DNA-transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond., B.* **204**: 251-266
- Schmidt, R.** (1998) The *Arabidopsis thaliana* genome: Towards a complete physical map. (Ed. Anderson, M. and Roberts, J.A.). *Sheffield Academic Press, Sheffield*: 1-28
- Smith, D., Yanai, Y., Liu, Y.G., Ishiguro, S., Okada, K., Shibata, D., Whittier, R.F. und Fedoroff, N.V.** (1996) Characterization and mapping of Ds-GUS-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J.* **10(4)**: 721-732
- Schubert, D.** (1999) Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Selker, E.U.** (1999) Gene silencing: repeats that count. *Cell* **97**: 157-160

- Shirsat, A.H., Wilford, N. und Croy, R.R.D.** (1989) Gene copy number and levels of expression in transgenic plants of a seed specific promotor. *Plant Sci.* **61**: 75-80
- Sijen, T., Willink, J., Hiriart, J.B. und Van Kammen, A.** (1996) RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delination of targeted regions. *Plant Cell* **8**: 2277-2294
- Simoens, C.R., Gielen, J., Van Montagu, M. und Inzé, D.** (1988) Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nuc. Ac. Res.*, Vol. 16, Nr. **14**: 6753-6766
- 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** (4): 169-178
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Morris, P.C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Gray, J.E., Arnold, C., Tucker, G.A., Schuch, W., Harding, S. und Grierson, D.** (1990) Inheritance and effect on ripening of *antisense* polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.*, **14**: 369-379
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stam, M., Mol, J.N.M. und Kooter, J.M.** (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* **79**: 3-12
- 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**: 61656177
- Tanzer, M.M.** (1997) Characterization of post-transcriptionally suppressed transgene expression that confers resistance to tobacco etch virus infection in tobacco. *Plant Cell* **9**: 1411-1423
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Sequence and analysis of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thomas, C.M., Jones, D.A., English, J.J., Carroll, B.J., Bennetzen, J.L., Harrison, K., Burbidge, A., Bishop, G.J. und Jones, J.D.G.** (1994) Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 573-585
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloecker, V., Bravo-Angel, A.M. und Hohn, B.** (1995) The *agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.* **14**: 3585-3595
- Tinland, B.** (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**: 178-183
- Topping, J.F., Wei, W. und Lindsey, K.** (1991) Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Dev.* **112**: 1009-1019
- van Blockland, R., van der Geest, N., Mol, J.N.M. und Kooter, J.M.** (1994) Transgene mediated suppression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA-turnover. *Plant J.* **6**: 861-877
- van Blockland, R., ten Lohuis, P.I. und Meyer, P.** (1997) Condensation of chromatin in transcriptional regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 1-13

- van Lijsebettens, M., Inzé, D., Schell, J. und von Montagu, M.** (1986) Transformed cell clones as a tool to study T-DNA integration mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Mol. Biol.* **188**: 129-145
- van der Graaff, E., den Dulk-Ras, A. und Hooykaas, P.J.J.** (1996) Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Molecular Biology* **31**: 677-681
- van der Krol, A. R., Lenting, P.E., Veenstra, L., van der Meer, I., Koes, R.F., 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**: 866-868
- van der Krol, A. R., Mur, L.A., de Lange, P., Gerats, A.G.M., Mol, J.N.M. und Stuitje, A.R.** (1990) *Antisense* chalcone synthase genes in petunia: Visualization of variable transgene expression. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 204-212
- van Houdt, H., Ingelbrecht, I., van Montagu, M. und Depicker, A.** (1997) Post-transcriptional silencing of neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *Plant J.* **12**: 379-392
- Valvekens, D., van Montagu, M. und van Lijsebettens, M.** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Arabidopsis root explants using Kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 5536-5540
- Vaucheret** (1994) Identifikation of a general silencer for 19S und 35S promotors in a transgenic tobacco plant: 90 bp of homology in promotor sequences are sufficient for trans-inactivation. *C.R. Acad. Sci. Paris* **316**: 1471-1483
- Vaucheret, H., Beelin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon C., Morel, J.B. Mourrain, P., Palauqui, J.C. und Vernhettes, S.** (1998a) Transgene induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**: 651-659
- Vaucheret, H., Elmayan, T., Thierry, D., van der Geest, A., Hall, T., Conner, A.J., Mlynarova, L. und Nap, J.-P.** (1998b) Flank matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent trans-silencing in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 388-392
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., van Montagu, M. und Schell, J.** (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* **26**: 33.,48
- Voinnet, O. und Baulcombe, D.C.** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553
- Wallroth, M.** (1986) Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 6-15
- Wang, B.M. und Waterhouse, P.M.** (2000) High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *P. Mol. Biol.* **43**: 67-82
- Wang, F.A., Stachel, S.E., Timmerman, B., van Montagu, M., Zambryski, P.C.** (1987) Site-specific nick in the T-DNA Border sequence as a result of *Agrobacterium vir* gene expression. *Science* **235**: 587-591
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. und Sanger, H.L.** (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567-576

- Wassenegger, M. und Pélissier, T.** (1998) A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **37**: 349-362
- Waterhouse, P.M., Graham, H.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. U.S.A.* **95**:13959-13964
- Williamson, J.D., Hirsch-Wyncott, M.E., Larkins, B.A. und Gelvin, S.B.** (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **90**: 1570-1576
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. und Meyerowitz, E.M.** (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-39
- 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**: 10881-10886
- Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K. und Goodman, H.** (1982) Tumour induction by *Agrobacterium tumefaciens*, analysis of the boundaries of the T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**: 361-370

Abstract

Analyses of T-DNA integration and the regulation of transgene expression were performed in *Arabidopsis thaliana*.

For a large number of single-copy T-DNA transformants the integration site of T-DNA was characterised in a detailed manner. The results revealed in most cases analysed small deletions of the border sequences and the adjacent T-DNA regions. This was established for sequences present at the left as well as the right ends of the integrated T-DNA. In almost all transgenic lines studied deletions were observed at the site of integration, which spanned up to 960 bp. Short additional sequences of unknown origin were found at junctions between T-DNA and plant DNA. Mapping of the T-DNA site of integration showed a random distribution along the *Arabidopsis* chromosomes, 30% of the insertions were found in genes. In only 3% of the lines studied T-DNA had integrated in repetitive sequences. This reveals a clear preference for T-DNA insertions in non-repetitive areas of the genome.

Expression analysis of 34 transgenic lines, which either harboured two copies of the GFP (*green fluorescent protein*) reporter gene or the β -glucuronidase gene (GUS) under the control of the CaMV 35S promoter showed a uniformly high and stable expression over the course of several generations. Lines, which were hemizygous for the T-DNA revealed a 50% reduced expression level in comparison to homozygous plants. Thus, an additive gene dosage effect could be established for both reporter genes. The presence of different repetitive elements in immediate vicinity of a transgene did not influence the uniformly high and stable GUS reporter gene activity. Likewise, a pronounced influence of the chromosomal environment on reporter gene expression was not found. Transformants, which were present at different positions in the *Arabidopsis* genome showed a similar level of reporter gene activity.

Earlier studies had shown that the presence of three or more GUS reporter genes under control of the CaMV 35S promoter led to post-transcriptional gene silencing (PTGS) in *Arabidopsis*. In the context of this work it could be unambiguously demonstrated that homologous coding sequences which were not transcribed did not trigger silencing. This supports the model that a high transcript level initiates mRNA degradation. Investigations of antisense suppression revealed a reduced transcript level for a GUS antisense reporter gene under control of the CaMV 35S promoter in comparison to that of a sense transgene. It could be shown that a single copy of an antisense transgene suppresses up to three copies of a sense reporter gene. In all cases a uniformly low expression was found. The level was comparable to that established for post-transcriptionally silenced GUS genes in sense orientation.

7 Anhang

Im folgenden ist die molekulare Analyse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten T-DNA Transformanten (vergl. Abb. 3.1.4.2 und Tabelle 3.3) zusammengefasst. Hybridisierungen mit den Sonden GUS und GFP bzw. p35S detektieren die Reportergerkassetten bzw. die repetitiven Elemente. Die Anordnung der Sonden NPT, HPT, GUS und p35S zu den korrespondierenden T-DNA Regionen sind Abb. 3.2 zu entnehmen.

GUS 1xr pAL	Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S
27*	1	1	1	2	1	1
28	2	n.d.	n.d.	2	1	1
40	1	n.d.	1	1	1	1
41	1	n.d.	1	n.d.	1	1
42*	1	1	1	1	1	1
43	1	n.d.	1	1	1	1
53	2	n.d.	keine RB	keine RB	1	kein pAL
100	2	n.d.	1	n.d.	2	1
101*	1	1	1	1	1	1
103*	1	1	1	1	1	1
104	1	n.d.	n.d.	3	1	kein pAL
107	1	n.d.	n.d.	2	1	kein pAL
110	2	n.d.	n.d.	1	1	kein pAL
112	2	n.d.	n.d.	2	1	1
113	1	n.d.	n.d.	2	2	1
114	1	n.d.	2	2	2	1
115	2	n.d.	n.d.	4	1	1
122	2	n.d.	1	n.d.	1	1
123	1	n.d.	n.d.	2	kein GUS	1
124	1	n.d.	n.d.	1	kein GUS	kein pAL
125	1	n.d.	keine RB	1	1	1
126*	1	1	1	1	1	1
127	1	n.d.	2	1	1	1
128	4	n.d.	4	n.d.	1	1
129	1	n.d.	1	n.d.	kein GUS	kein pAL
130	2	n.d.	1	n.d.	1	1
131	3	n.d.	2	n.d.	1	kein pAL
135	1	n.d.	1	n.d.	1	kein pAL
GUS 1xr 501	Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S
16	1	n.d.	1	2	2	1
100	2	n.d.	1	1	1	1
101	2	n.d.	2	n.d.	2	1
102	1	n.d.	2	1	1	1
103	4	n.d.	3	4	2	1
105	1	n.d.	2	n.d.	1	1
106	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
107*	1	1	1	1	1	1
109	2	n.d.	3	1	1	n.d.
110	2	n.d.	2	n.d.	1	1
112	2	n.d.	2	2	1	1

Anhang

114	1	n.d.	keine RB	2	kein GUS	kein 501
115	4	n.d.	3	n.d.	3	n.d.
116*	1	1	1	n.d.	1	1
117	1	n.d.	2	n.d.	1	1
118	2	n.d.	2	n.d.	1	1
121	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	1
124	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	1
128*	1	n.d.	1	1	1	1
130	1	n.d.	keine RB	n.d.	1	n.d.
134	2	n.d.	n.d.	n.d.	2	n.d.
142	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
143	2	n.d.	1	n.d.	2	n.d.
145	2	n.d.	keine RB	n.d.	1	n.d.
146	2	n.d.	3	n.d.	1	n.d.
147	2	n.d.	keine RB	n.d.	2	n.d.
148	1	n.d.	keine RB	n.d.	1	n.d.
149	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
150	2	n.d.	1	n.d.	2	n.d.
152	2	n.d.	2	n.d.	2	n.d.
153	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
GUS 1xr 502						
Hybridisierung mit der Sonde						
	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S
4	2	n.d.	n.d.	2	n.d.	1
100	1	n.d.	1	2	1	n.d.
101	2	n.d.	2	1	1	n.d.
102	1	n.d.	2	2	1	1
103	2	n.d.	1	n.d.	1	1
104	3	n.d.	2	1	3	1
105	2	n.d.	2	1	1	1
109	2	n.d.	keine RB	n.d.	1	1
110	2	n.d.	2	2	kein GUS	kein 502
111*	1	1	1	1	1	1
114	1	n.d.	1	n.d.	1	kein 502
115	2	n.d.	1	n.d.	1	1
116	2	n.d.	3	n.d.	1	1
119*	1	1	1	1	n.d.	1
120	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
121	1	n.d.	2	n.d.	kein GUS	kein 502
122*	2	1	1	1	1	1
124	2	n.d.	2	n.d.	2	kein 502
127	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
128	3	n.d.	3	n.d.	3	n.d.
129*	1	1	1	1	1	kein 502
132	1	n.d.	keine RB	n.d.	1	n.d.
134	4	n.d.	3	n.d.	1	n.d.
135	3	n.d.	keine RB	n.d.	1	n.d.
136	n.d.	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
144	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
145	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
146	2	n.d.	2	n.d.	2	n.d.
147*	1	1	1	1	1	1
148*	1	1	1	1	1	1
149	2	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
153*	1	1	1	1	1	1
GUS 1xr rDNA						
Hybridisierung mit der Sonde						
	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S

24*	1	1	1	1	1	1
35	1	n.d.	2	1	1	1
100	1	n.d.	keine RB	n.d.	1	keine rDNA
102	1	n.d.	1	n.d.	1	1
103	2	n.d.	2	2	2	1
104*	1	1	1	1	1	1
107	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	keine rDNA
108	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	keine rDNA
110	4	n.d.	1	1	1	1
111	2	n.d.	1	n.d.	1	n.d.
112	4	n.d.	2	n.d.	2	n.d.
114	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
115	1	n.d.	keine RB	n.d.	3	1
117*	1	1	1	1	1	1
118	2	n.d.	2	n.d.	2	n.d.
119	2	n.d.	2	n.d.	kein GUS	1
121	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	keine rDNA
122	3	n.d.	2	n.d.	2	n.d.
123	2	n.d.	1	n.d.	2	n.d.
124	2	n.d.	2	n.d.	1	n.d.
125*	1	1	1	1	1	1
126	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
127	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS	n.d.
128*	1	1	1	1	1	1
Hybridisierung mit der Sonde						
GUS 1xr 163	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S
4	n.d.	n.d.	n.d.	2	1	1
102	3	n.d.	n.d.	1	1	1
103	4	n.d.	n.d.	4	1	1
104	1	n.d.	n.d.	2	1	1
106	1	n.d.	n.d.	2	2	kein 163
120	5	n.d.	n.d.	2	1	1
122	2	n.d.	n.d.	1	1	1
123*	1	1	1	1	1	1
124	2	n.d.	n.d.	1	1	1
125	2	n.d.	n.d.	1	1	1
127	1	n.d.	keine RB	1	kein GUS	1
128	2	n.d.	keine RB	keine RB	1	1
130	2	n.d.	n.d.	2	1	1
131	1	n.d.	1	n.d.	kein GUS	n.d.
132*	1	1	1	1	1	kein 163
133	1	n.d.	keine RB	keine RB	1	kein 163
134	2	n.d.	1	2	1	1
135*	1	1	1	1	1	1
136	1	n.d.	keine RB	keine RB	kein GUS	kein 163
137	1	n.d.	keine RB	keine RB	1	1
138*	1	n.d.	1	1	1	1
139*	1	1	1	1	1	1
140	1	n.d.	2	n.d.	1	1
143	1	n.d.	2	n.d.	1	1
145	2	n.d.	2	n.d.	1	1
Hybridisierung mit der Sonde						
GUS 1xr 164	NPT	LB	HPT	RB	GUS	p35S
15	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
17	2	n.d.	2	n.d.	1	1
102*	1	1	1	1	1	1

Anhang

104	2	n.d.	3	n.d.	1	1
110	1	n.d.	n.d.	1	1	kein 164
112	1	n.d.	2	1	1	1
113*	1	1	1	1	1	1
114	2	n.d.	n.d.	2	2	1
117	2	n.d.	2	2	2	1
119	1	n.d.	1	1	1	1
120	1	n.d.	n.d.	1	1	kein 164
122	2	n.d.	n.d.	1	1	kein 164
125	1	n.d.	n.d.	2	1	kein 164
128	2	n.d.	n.d.	3	1	1
129*	1	1	1	1	1	1
130	2	n.d.	n.d.	1	1	1
131	2	n.d.	2	2	1	1
133	2	n.d.	2	2	n.d.	n.d.
134	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
135	1	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.	n.d.
140	1	n.d.	3	n.d.	n.d.	n.d.
142	1	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
143	2	n.d.	4	n.d.	n.d.	n.d.
144	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
146	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
152	2	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.
154	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.	n.d.
155	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.	n.d.
156	2	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.
157	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.	n.d.
158	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.	n.d.

ΔGUS	Hybridisierung mit der Sonde				
	NPT	LB	HPT	RB	GUS
100	2	n.d.	keine RB	n.d.	1
101*	1	1	1	1	1
102*	1	1	1	1	1
103	1	n.d.	2	n.d.	1
104	2	n.d.	1	n.d.	1
105*	1	1	1	1	1
106	1	n.d.	keine RB	n.d.	1
109	3	n.d.	3	n.d.	1
110	2	n.d.	1	n.d.	1
111*	1	1	1	1	1
112	2	n.d.	2	n.d.	1
113*	1	1	1	1	1
114	1	n.d.	keine RB	n.d.	1
115	4	n.d.	2	n.d.	2
118	4	n.d.	2	n.d.	n.d.

ΔGUS 2a	Hybridisierung mit der Sonde				
	NPT	LB	HPT	RB	GUS
109	1	n.d.	keine RB	n.d.	2
112	2	n.d.	n.d.	n.d.	2
113	1	n.d.	keine RB	n.d.	2
114	3	n.d.	n.d.	n.d.	1
115	1	n.d.	n.d.	n.d.	2
116	1	n.d.	n.d.	n.d.	2
117*	1	1	1	1	2
118	2	n.d.	n.d.	n.d.	2
121	4	n.d.	n.d.	n.d.	2

123	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GUS
124	1	n.d.	n.d.	n.d.	1
125	1	n.d.	n.d.	n.d.	1
132	3	n.d.	2	n.d.	1
133*	1	1	1	1	2
136	1	n.d.	2	n.d.	n.d.
139	2	n.d.	2	n.d.	n.d.
142	2	n.d.	3	n.d.	n.d.
143	2	n.d.	3	n.d.	n.d.
GUS AS r					
Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	GUS
100*	1	1	1	1	1
101*	1	1	1	1	1
102	1	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
103*	1	1	1	1	1
107*	1	1	1	1	1
108	4	n.d.	n.d.	n.d.	1
110	4	n.d.	n.d.	n.d.	1
112	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
114	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
117	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
118	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
119	1	n.d.	3	n.d.	1
120	1	n.d.	3	n.d.	1
GUS S/AS f					
Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	GUS S + AS
100	1	n.d.	1	1	2
102*	1	1	1	1	2
103	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
104	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
105	1	1	1	1	2
106	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
107	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
108	1	n.d.	2	n.d.	n.d.
109	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
110	1	n.d.	1	n.d.	n.d.
111	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
112*	1	1	1	1	2
113*	1	1	1	1	2
116	1	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
118	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
119	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
121	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
123	3	n.d.	2	n.d.	n.d.
124	2	n.d.	1	n.d.	n.d.
125	2	n.d.	2	n.d.	n.d.
133*	1	1	1	1	2
134	2	n.d.	2	n.d.	n.d.
135*	1	1	1	1	2
137*	1	1	1	1	2
140*	1	1	1	1	2
144*	1	1	1	1	2
145*	1	1	1	1	2
mGFP 1xf					
Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	mGFP

2	2	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
3	2	n.d.	n.d.	n.d.	kein GFP
6	2	n.d.	1	n.d.	n.d.
7	1	n.d.	1	n.d.	kein GFP
8*	1	1	1	1	1
10	2	n.d.	1	n.d.	n.d.
18*	1	n.d.	1	1	1
23	2	n.d.	1	n.d.	1
33	2	n.d.	n.d.	n.d.	2
100	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
102	1	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
105	2	n.d.	2	n.d.	2
106	1	n.d.	keine RB	n.d.	n.d.
107*	1	1	1	1	1
110	1	1	3	3	2
111	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
113	3	n.d.	2	n.d.	n.d.
114	2	n.d.	keine RB	n.d.	kein GFP
116	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
118	2	n.d.	2	n.d.	n.d.
128*	1	1	1	1	1
133	2	n.d.	n.d.	n.d.	kein GFP
mGFP 1xr					
Hybridisierung mit der Sonde					
	NPT	LB	HPT	RB	mGFP
6	1	n.d.	2	n.d.	1
12	2	n.d.	1	1	1
101	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
104	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
105	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
111*	1	1	1	1	1
115	2	n.d.	1	n.d.	n.d.
116	2	n.d.	n.d.	n.d.	1
120	2	n.d.	2	n.d.	n.d.
121	2	n.d.	1	n.d.	1
126	n.d.	n.d.	2	n.d.	n.d.
127	2	2	1	1	1
128	1	n.d.	keine RB	n.d.	kein GFP
129*	1	1	1	1	1
145*	1	1	1	1	1
146	2	n.d.	1	n.d.	1
152	1	n.d.	keine RB	n.d.	1
154	2	n.d.	1	n.d.	kein GFP
155*	1	1	1	1	1

Tabelle 6.1 Ergebnisse der Southern Blot Analyse von T-DNA Transformanten

A. thaliana DNA wurde mit jeweils zwei Restriktionsenzymkombinationen gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebロットet und mit den entsprechenden radioaktiv markierten Fragmenten hybridisiert. Angegeben ist die Anzahl der integrierten Regionen der LB (NPT und LB Sonde), RB (HPT und RB Sonde). Angegeben ist weiterhin die Anzahl der GUS bzw. GFP Reportergen-kassetten und die Anzahl der untersuchten repetitiven Elemente. Es wurden Deletionen und zusätzliche unvollständige Kopien nachgewiesen. Die mit * markierten T-DNA Linien entsprechen den Transformanten, die eine intakte T-DNA aufweisen und für die unter 3.2 und 3.3 aufgeführten Analysen eingesetzt wurden. Abkürzungen: n.d.: nicht detektiert (nicht analysiert); RB: rechte Grenze der T-DNA, LB: linke Grenze der T-DNA. Die T-DNA Linien GUS 1xr pAL 40, 41, 42 und 43 sind auf ein Transformationsereignis einer Wurzeltransformation zurückzuführen und stellen die gleiche transgene Linie dar.

GUS 2xr 126	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAATATA
GUS 1xr pAL 103	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAATAT
SPT 3xf 103	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAATA
GUS 1xr 163 135	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAAT
GUS 1xf 110	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAAT
GUS1xrpAL101	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAA
GUS 3xf 112	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAA
GUS 1xr 502 111	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGA
SPT/GUS f 102	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGA
mGFP 1xf 129	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGA
GUS 1xr rDNA 24	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTG
G/S/G r 114	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTG
GUS 1xf 30	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATT
SPT 3xf 139	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATT
GUS 1xr 30	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAAT
GUS 2xf 101	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAA
GUS 3xr 105	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACA
SPT 3xf 108	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACA
G/S/GFP f 126	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTACA
SPT/GUS f 100	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTAC
GUS 2xr 123	TTTCCCGGACATGAAGCCATTTA
G/S/G r 125	TTTCCCGGACATGAAGCCATTT
G/S/G f 125	TTTCCCGGACATGAAGCCATTT
SPT/GUS f 110	TTTCCCGGACATGAAGCCATT
GUS S/AS f 102	TTTCCCGGACATGAAGCCATT
GUS/SPT f 114	TTTCCCGGACATGAAGCCAT
ΔGUS 2a 117	TTTCCCGGACATGAAGCCAT
GUS 1xr rDNA 104	TTTCCCGGACATGAAGCC
GUS 2xf 129	TTTCCCGGACATGAAGCC
GUS 1xr 18	TTTCCCGGACATGAAGCC
GUS 3xr 130	TTTCCCGGACATGAAGCC
GUS 1xr 105	TTTCCCGGACATGAAGCC
GUS S/AS f 112	TTTCCCGGACATGAAGCC
G/S/G f 133	TTTCCCGGACATGAA
G/S/GFP f 130	TTTCCCGGACATGA
GUS 1xr pAL 126	TTTCCCGGACAT
mGFP 1xf 18	TTTCCCGGA
GUS 2xr 20	TTTCCCG
mGFP 1xr 111	TTTCC
GUS 1xr 502 122	---
G/S/G r 129	---
SPT 1xf 107	---
GUS 1xr 69	---
GUS 1xf 60	---
SPT/GUS f 122	---
GUS 1xr 164 113	---
GUS 1xr pAL 27	---

Tabelle 6.2 Ergebnisse des Vergleichs der LB Sequenzen

Dargestellt sind die Sequenzen der Borderendbereiche verschiedener transgener Linien. Die hervorgehobenen blauen und roten Sequenzen entsprechen der LB bzw. den angrenzenden T-DNA Bereichen. Der Vergleich erfolgte zu Sequenzen des zur Transformation verwendeten Ti-Plasmides.

G/S/G f 125	CGAGCTTTCTAATTT
SPT 3xf 139	CGAGCTTTCTAA
GUS 1xr 502 119	CGA
SPT 3xf 108	---
SPT 3xf 147	---
G/S/GFP r 110	---
RB	GGCAGGATATATACCGTTGTAATT
GUS 1xr 18	GG
GUS 1xr 69	GG
GUS 1xf 30	GG
GUS 1xf 110	GG
GUS 1xr 164 102	GG
GUS 1xr pAL 126	GG
SPT 2xf 107	GG
mGFP 1xr 111	GG
mGFP 1xr 129	GG
SPT 1xr 107	GG
GUS 2xf 101	GG
GUS S/AS f 140	GG
ΔGUS 112	GG
mGFP 1xf 8	G
G/S/GFP f 136	G
ΔGUS 2a 117	G
GUS 2xr 126	G
GUS 2xf 129	G
SPT/GUS f 102	---
SPT 2xf 104	---
GUS 2xr 123	---
GUS 1xr 501 116	---
SPT 3xf 103	---
SPT/GUS f 110	---
SPT/GUS f 122	---
G/S/G r 114	---
G/S/G r 125	---
G/S/G r 129	---
G/S/GFP f 144	---
GUS 3xf 122	---
GUS 2xr 125	---
GUS 2xf 113	---
GUS 1xr 163 135	---
SPT 3xf 154	---
GUS 1xr pAL 101	---
GUS 1xr pAL 27	---
GUS 2xf 109	---
GUS 2xf 110	---
G/S/GFP f 130	---
GUS S/AS f 112	---
GUS AS r 107	---
GUS 1xr pAL 103	---
GUS 2xf 20	---
GUS 1xr rDNA 24	---
mGFP 1xf 18	---
G/S/GFP r 115	---
GUS 1xr 164 113	---
GUS 3xr 130	---
GUS 3xr 103	---
GUS 1xr 502 122	---
GUS 1xf 60	---
GUS 3xr 105	---
GUS 1xr 30	---
GUS S/AS f 102	---

GUS S/AS f 145	---
G/S/GFP f 126	---
GUS 3xf 118	---
SPT/GUS f 114	---
G/S/G r 133	---
GUS 3xf 112	---
SPT/GUS f 104	---
SPT/GUS f 100	---
GUS 1xr rDNA 104	---
GUS 1xr pAL 42	---
GUS 1xr 502 111	---
GUS 1xr 163 138	---
GUS 1xr 105	---
G/S/G f 125	---
SPT 3xf 139	---
GUS 1xr 502 119	---
SPT 3xf 108	---
SPT 3xf 147	---
G/S/GFP r 110	---

Tabelle 6.3 Ergebnisse des Vergleichs der RB Sequenzen

Dargestellt sind die Sequenzen der Borderendbereiche verschiedener transgener Linien. Die hervorgehobenen blauen und roten Sequenzen entsprechen der RB bzw. den angrenzenden T-DNA Bereichen. Der Vergleich erfolgte zur Sequenz des zur Transformation verwendeten Ti-Plasmides.

T-DNA Linie	iPCR Fragment	Restriktionsenzym	Arab. Homologie	kognitiver Locus (BAC/Pos.)	Bestätigungs PCR RB/LB	Nukl. Insert. T-DNA	Border LB RB	T-DNA/Pflanzen-DNA Verbindung	Nukl. Insert. A. th.	Integrationsort
GUS 1xf 30	RB*	BstYI	+	IV-AL035527 F17L22	LB ok RB ok	1-287 1-163	31-317 43-205	Id. Nukl. 5 bp präzise	282 164	79788 79816 28 bp
GUS 1xf 57	LB	BstYI	-							
GUS 1xf 60	LB*	BstYI	+	III-AP000370 K15M2	LB ok RB ok	5-224 1-161	25-244 25-185	präzise filler bp 9	225 170	14237 14335 Deletion 98 bp
GUS 1xf 110	RB*	BstYI	+	II-AC006340 section 128	LB ok RB ok	5-269 5-180	57-321 30-205	filler bp 4 Id. Nukl. 2 bp	273 178	58407 58418 Deletion 11 bp
GUS 1xf 117	LB*	BstYI	+	V-AB013392 MIK19	LB ok RB Ti	1-306 1-563	26-330 146-708	Filler bp 20	326	30526 Ti
GUS 1xr 18	RB*	BstYI	+	I-AC079284 F8A12	LB ok RB ok	1-22 1-62	286-306 144-205	filler bp 25 präzise	47 63	69279 69256 Deletion 23 bp
GUS 1xr 30	RB*	BstYI	+	I-AC004122 T27II	LB ok RB ok	1-291 1-148	26-316 27-174	Id. Nukl. 2 bp filler bp 38	289 186	17350 17381 Deletion 31 bp
GUS 1xr 69	RB*	BstYI	+	II-AC005309 section 254	LB ok RB ok	1-226 5-70	29-254 140-205	filler bp 96 Id. Nukl. 1 bp	322 70	82348 82361 Deletion 13 bp
GUS 2xf 20	RB"	BstYI	+	II-AL132956 F2K15	LB ok RB ok	2-273 1-53	25-296 144-196	Id. Nukl. 3 bp präzise	270 54	50026 49970 Deletion 56 bp
GUS 2xf 23	LB	BstYI	+	II-AC007196 T18C2/F3C11	LB Ti RB ok	1-111 1-69	170-281 122-190	(iPCR) bp 115-326: pCLD 5888-6099=2. LB filler bp 13	82	24032 Ti
GUS 2xf 101	LB"	BstYI	+	III-AC016829.5 T6K12	LB ok RB ok	2-292 1-84	25-315 122-205	Id. Nukl. 3 bp filler bp 6	289 90	22032 22029 Deletion 3 bp
GUS 2xf 109	RB	BstYI	+	II-AC005398 section 84	LB ok RB ok	2-305 1-78	25-329 122-199	Id. Nukl. 1 bp präzise	305 79	26068 26101 Deletion 33 bp

GUS 2xf 110	LB	BstYI	+	III-AC024128 MGH6	LB ok	219-xxx	12-339	Id. Nukl. 2 bp	217	1140	Deletion
					RB ok	513-566	126-198	filler bp 140	373	1262	122 bp
GUS 2xf 113	RB	BstYI	+	II-AC007169 section 117	LB ok	431-xxx	7-329	filler bp 31	400	3328	Deletion
					RB ok	625-792	69-202	Id. Nukl. 1 bp	626	3348	20 bp
GUS 2xf 119	RB	BstYI	+	IV-Z97338.2 Essa I contig3	LB ?	weitere Analysen fehlen					
					RB ok	1-63	143-205	präzise	64	169260	
GUS 2xf 151	LB	BstYI	+	VI-AB012239 K11J9	LB ok	1-295	26-319	filler bp 8	303	29668	Border
					RB -						
GUS 2xr 123	RB	BstYI	+	III-AC018363 F13E7	RB ok	498-549	127-178	filler bp 178	320	28611	
					LB ok	Sequenzierungsqualität nicht ausreichend					
GUS 2xr 125	LB	BstYI	+	I-AC015986 T2E12	LB ok	214-291	235-312	filler bp 14	305	13290	perfekt
					RB ok	1-174	30-203	filler bp 17	191	13291	
GUS 2xr 126	LB	BstYI	+	I-AC007918 38.000	LB ok	1-44	286-329	filler bp 44	88	10027	Deletion
					RB ok	1-57	146-202	filler bp 23	70	10013	14 bp
GUS 3xr 100	RB	BstYI	+	III-AL162507 T12C14	LB ok	445-734	22-324	Id. Nukl. 1 bp	445	38121	Deletion
					RB ok	253-456	1-204	filler bp 4	249	38146	25 bp
GUS 3xr 103	RB	BstYI	+	I-AC013354 F15H18	LB Ti	(Southern Blot Analyse)					
					RB ok	2-23	122-143	filler bp 19	42	35232	Ti
GUS 3xr 105	LB/ RB	BstYI BstYI		I-AC004133 F5A9	LB ok	1-44	286-329	filler bp 61	105	72558	Deletion
					RB ok	2-161	25-184	filler bp 48	209	72544	14
GUS 3xr 117	RB"	BstYI	+	I-AC016662 F2P9	LB ok	1-286	29-314	filler bp 3	289	90642	Deletion
					RB ok	57-157	80-179	filler bp 11	168	90626	16 bp
	LB	BclI	+	IV-AL161512 contig 24	LB -						
					RB ok	296-377	127-207	filler bp 57	239	31161	Translokation
	LB				LB	1-44	286-329	filler bp 38	82	124568	Translokation
					RB -						

GUS 3xr 126	RB	BstYI	+	II-AC005851 section 158	(Southern Blot Analyse)						
					LB Ti	1-20	144-163	filler bp 197	217	63107	Ti
GUS 3xr 130	LB	BstYI	+	V-AB010069 MAC9	LB ok	1-22	286-307	filler bp 18	40	22249	Deletion
					RB ok	1-43	144-186	filler bp 6	49	22219	30 bp
GUS 3xr 133	LB	BstYI	+	III-AB025634 MSD21	LB ok	1-285	26-310	filler bp 4	289	23840	Ti
					RB Ti	2-61	146-205	bp 60-530; pCLD bp 25290-25759			
GUS 3xf 101	RB	BstYI	-	Ti Plasmid	RB Ti	5-66	144-205	bp 236-317; pCLD bp 303-437			
GUS 3xf 106	RB*	BstYI	+	II-AC006418 F13A10	(PCR)						
					RB +	504-xxx	1-204	filler bp 42	462	38878	Ti
GUS 3xf 112	RB	BstYI	+	IV-AL137189.2 F7J8	LB ok	1-296	25-320	Id. Nukl. 1 bp	295	82489	Deletion
					RB ok	1-148	25-172	filler bp 45	193	82583	94 bp
GUS 3xf 113	LB	BstYI	+	I-AC058785 F13N6	LB ok	3-292	25-314	filler bp 25	317	43704	Ti
					RB Ti	(Southern Blot Analyse)					
GUS 3xf 118	RB	BclI	+	II-AC007019 F7D8/T16B14	LB ok	1-27	299-325	Id. Nukl. 1 bp	27	58199	Deletion
					RB ok	1-29	145-173	filler bp 25	54	58183	16 bp
GUS 3xf 122	RB	BclI	+	V-AB006707 MYC6	LB ok	1-45	286-330	filler bp 4	49	66890	Deletion
					RB ok	1-58	145-202	Id. Nukl. 2 bp	56	66944	54 bp
SPT 1xr 76	RB	BstYI	-	Ti Plasmid	RB Ti	1-352	154-505				
SPT 1xr 83 RB-RB IR Repeat	LB	BstYI	+	V-AB026651 MQD19	LB-LB	237-554	1-318	Id. Nukl. 71 bp	308	64247	Deletion
					LB-RB	233-554	1-318	Id. Nukl. 6 bp	239	64812	565 bp
SPT 1xr 103 Linie nicht ok	LB*	BstYI	+	IV-AL031187 T6K22	LB ok	393-xxx	1-308	Id. Nukl. 1 bp	393	22682	Ti
					RB Ti	(PCR)					
SPT 1xr 107	RB2	BclI	+	I-AC000375 F19K23	LB ok	31-52	235-256	Id. Nukl. 1 bp	52	85155	Deletion
					RB ok	1-62	144-205	filler bp 19	81	85148	7 bp
SPT 1xr 109	LB	BclI	+	I-AC007508.2 F1K23	LB ok	1-23	286-307	filler bp 112	135	39403	Ti
					RB Ti	1-418	129-546				(iPCR)
SPT 1xr 124	RB	BstYI	+	I-AC007980.1							

F1413		LB Ti (PCR)	LB ok	648-461	1-188	filler bp 13	448	73315
SPT 1xr 130	RB	BstYI +	I-AC007894	F21H2	U66842.1 ZMU66842: Zea mays Ds6-like insertion element			
SPT 1xr 141	RB	BstYI +	X15550.1		filler bp 25	85	69532	Ti/Ds
SPT 2xr 101	LB	BstYI -	Ti Plasmid		keine Borderhomologie	260	4139	Deletion
SPT 2xr 103	LB	BclI	I-AC007190	F23N19	filler bp 3	27	4290	151 bp
SPT 2xf 104	LB	BstYI +	I-AC023628	F6F3	filler bp 55	357	87382	Deletion
SPT 2xf 105	LB	BstYI +	I-AC008263	F25A4	filler bp 40	239	87384	2 bp
SPT 2xf 107	LB	BstYI +	IV-AB016871	K16L22	filler bp 9	68	79409	39 bp
SPT 2xf 129	LB	BstYI +	III-AL132968	T18N14	filler bp 26	372	41526	Deletion
SPT 2xf 133	LB	BstYI +	IV-AB005237	MJ3	präzise	61	41477	49 bp
SPT 3xr 102	LB	BstYI -	Ti Plasmid		filler bp 34	56	28990	Deletion
SPT 3xr 106	LB	BstYI -	Ti Plasmid		filler bp 6	64	29019	29 bp
SPT 3xf 100	LB	BclI -	Ti Plasmid		filler bp 11	28	67109	
SPT 3xf 103	LB	BstYI +	I-AC067971.5	F10K1	filler bp 39	346	67270	Deletion
SPT 3xf 108	LB	BstYI +	V-AL391222.1	T5K6	präzise	59	67363	93 bp
SPT 3xf 139	RB"	BstYI +	II-AC004482.2	section 134	Id. Nukl. 7 bp	287	67455	Deletion
					filler bp 9	111	67426	29 bp
					filler bp 79	88	52055	Deletion
					filler bp 252	432	52052	3 bp

SPT 3xf 147	RB"	BstYI	+	IV-AL078465.1 T15N24	LB ok	4-308	25-329	Id. Nukl. 3 bp	305	57565	Deletion
					RB ok	1-24	25-48	filler bp 138	162	57549	16 bp
SPT 3xf 154	LB	BstYI	+	V-AL391712.1 T5E8	LB ok	8-50	287-329	Id. Nukl. 2 bp	48	21242	Deletion
					RB ok	1-58	144-201	Id. Nukl. 4 bp	54	21273	31 bp
SPT 3xf 159	LB	BclI	+	V-AB005241 MOP10	LB-LB	1-51	289-319	Id. Nukl. 9 bp	42	15160	Deletion
					LB-RB	1-33	286-318	präzise	34	15151	9 bp
SPT 3xf 162	RB	BclI	-	Ti Plasmid	RB Ti	pCLD 27085-26843 (iPCR)					
mGFP 1xf 8	RB	BstYI	+	I-AC007980.1 F1413	LB ok	328-643	44-329	präzise	329	59675	Id. Nukl.
					RB ok	444-645	3-204	präzise	443	59675	1 bp
mGFP 1xf 18	RB	BclI	+	III-AB028610 MCP4	LB ok	1-15	284-298	Id. Nukl. 3 bp	12	2325	Deletion
					RB ok	5-60	141-196	Id. Nukl. 4 bp	56	2284	41 bp
mGFP 1xf 128	LB	BstYI	+	III-AC016829.5 T6K12	LB ok	1-6	292-297	filler bp 76	82	95710	Ti
					RB Ti	1-25	27-287:27009-27262, 287-566: 303-566 pCLD (iPCR)				
mGFP 1xr 111	RB	BstYI	+	II-AC007019.4 section 124	LB ok	2-271	25-294	Id. Nukl. 1 bp	270	101609	Deletion
					RB ok	1-181	25-205	Id. Nukl. 2 bp	179	101595	14 bp
mGFP 1xr 127	LB	BclI	+	I-AC000106.1 F7G19	LB ok	4-280	25-301	filler bp 14	294	55199	RB-RB
					LB-RB	Sequenzierungsqualität nicht ausreichend					
mGFP 1xr 129	LB	BstYI	+	I-AC03114 T12M4	LB ok	3-297	25-319	Id. Nukl. 1 bp	297	25150	Deletion
					RB ok	9-92	122-205	filler bp 24	116	25138	22 bp
mGFP 1xr 145	RB	BstYI	+	Ti Plasmid	RB Ti	1-23	120-143	bp 95-145: pCLD 297-347 (iPCR)			
					LB Ti	26-124	41-164	bp 125-246: pCLD 178-299 (iPCR)			
mGFP 1xr 155	LB	BstYI	+	Ti Plasmid	RB ok	1-46	29-74	filler bp 16	62	119020	Deletion
					RB ok	1-53	147-199	filler bp 32	85	119042	22 bp
GUS 1xr pAL 27	RB	BstYI	+	IV-Z97343 Essa I contig8	LB ok	1-39	286-324	Id. Nukl. 5 bp	34	53402	Deletion
					RB ok	1-20	144-163	filler 41 bp	61	53419	17 bp
GUS 1xr pAL 42	RB	BstYI	+	AB025629 MOE17	LB ok	8-41	284-317	filler bp 7	48	42428	41 bp
					RB ok	1-158	43-200	filler bp 12	170	42469	Deletion
GUS 1xr pAL 101	RB	BstYI	+	IV-AL078465 T15N24	LB ok	8-41	284-317	filler bp 7	48	42428	41 bp
					RB ok	1-158	43-200	filler bp 12	170	42469	Deletion

GUS 1xr pAL 102	RB	BstYI	+	I-AC074228 T7O23	1-69	137-205	filler bp 4	73	1070	Deletion
					LB ok	1-40	288-327	präzise	41	1108
GUS 1xr pAL 103	RB	BstYI	+	IV-AF069298.1 T14P8	1-298	26-323	filler bp 7	305	75226	Deletion
					RB ok	1-75	122-196	Id. Nukl. 3 bp	72	75166
GUS 1xr pAL 126	RB	XbaI	+	V-AB026651 MQD19	101-401	1-301	Id. Nukl. 1 bp	102	79411	Deletion
					RB ok	460-650	14-205	filler bp 16	444	79712
GUS 1xr 163 123	LB	BclI	+	I-AC006423 F28H19	Sequenzierungsqualität nicht ausreichend					
					RB ok	1-67	139-205	Id. Nukl. 1 bp	66	38323
GUS 1xr 163 132	RB	BstYI	+	V-AC007123.1 F21A20	LB Ti (PCR)					
					RB ok	1-40	164-203	filler bp 59	99	64596
GUS 1xr 163 135	RB	BstYI	+	I-AC000375.1 F19K23	1-36	25-60	filler bp 295	331	57280	Deletion
					RB ok	1-80	122-201	Id. Nukl. 1 bp	80	57327
GUS 1xr 163 138	RB	BstYI	+	II-AC004667.2 section 193	156-404	75-325	filler bp 5	161	59060	Deletion
					RB ok	332-494	1-163	filler bp 6	326	59063
GUS 1xr 163 139	RB	BstYI	+	III-AC021640.5 F16B3	LB Ti (PCR)					
					RB ok	330-533	1-204	filler bp 12	318	101159
GUS 1xr 164 113	LB	BstYI	+	III-AB024033.1 MBK21	4-134	26-156	präzise	135	60764	perfekt
					RB ok	8-66	129-187	filler bp 300	366	60765
GUS 1xr rDNA 24	LB	BclI	+	III-AC011437 F7O18	1-33	286-318	Id. Nukl. 2 bp	31	84241	Deletion
					RB ok	1-43	xxx-185	filler bp 15	58	84216
GUS 1xr rDNA 101	LB	BstYI	+	IV-AL022605.3 T19P19	1-279	39-317	filler bp 5	284	31651	RB-RB
					RB Homologie: II-AC005310.2-section249of255-27.000	IR Repeat				
RB-LB		-		-		-		1	27255	Translokation
GUS 1xr rDNA 104	LB	BstYI	+	V-AL356332.1 T31P6	5-26	286-307	filler bp 14	40	69447	Deletion
					RB ok	1-42	122-164	präzise	43	69464
GUS 1xr rDNA 117	LB	BstYI	+	IV-Z97338 Essa I contig3	2-60	290-348	Id. Nukl. 1bp	60	174445	Ti

GUS AS r 107	LB	BstYI	+	V-AL353013 T24H18	2-306	25-329	filler bp 25	331	73466	Deletion
					RB ok	6-174	29-197	Id. Nukl. 1 bp	173	73486
GUS S/AS f 102	RB	BcII	+	IV-AL161573.2 contig 69	13-15	270-272	filler bp 13	28	34262	Deletion
					RB ok	3-44	144-174	filler bp 30	74	34282
GUS 1xr 105	LB	BcII	+	III-AP001300.1 F5N5	1-21	287-307	filler 3 bp	24	15050	Deletion
					RB ok	1-18	146-163	filler bp 5	23	15063
GUS S/AS f 112	RB	BcII	+	II-AC007660 section 220	4-27	284-307	filler bp 11	38	51612	Deletion
					RB ok	1-72	183-204	filler bp 2	74	51609
GUS S/AS f 140	LB	BcII	+	III-AC009853 F21O3	6-310	25-329	Id. Nukl. 6 bp	304	54031	Deletion
					RB ok	4-68	141-205	präzise	69	53941
GUS S/AS f 145	LB	BcII	+	V-AB009053 MQB2	2-306	25-329	Id. Nukl. 2 bp	308	70891	Deletion
					RB ok	4-74	144-174	filler bp 9	83	70878
SPT/ GUS f 100	RB	BstYI	+	V-AF058826 T26D22	7-290	30-313	Id. Nukl. 1 bp	289	106410	Deletion
					RB ok	1-45	122-166	filler bp 6	51	106378
SPT/ GUS f 102	LB	BstYI	+	III-AP000375 MJG19	2-23	286-307	filler bp 10	33	35509	Deletion
					RB ok	1-59	145-203	Id. Nukl. 2 bp	57	35482
SPT/ GUS f 104	LB	BstYI	+	V-AL162875 T32M21	2-306	26-328	filler bp 55	361	338	Deletion
					RB ok	1-73	133-205	Id. Nukl. 2 bp	71	23
SPT/ GUS f 110	LB	BstYI	+	IV-AF080118 T8M21	1-279	36-310	filler bp 6	285	37563	Deletion
					RB ok	xxx-185	xxx-203	Id. Nukl. 1 bp	185	37541
SPT/ GUS f 114	RB	BstYI	+	IV-AC007633 T25P22	224-288	245-309	filler bp 5	293	49839	Id. Nukl.
					RB ok	464-636	1-173	filler bp 26	438	49839
SPT/ GUS f 122	LB	BstYI	+	IV-AL049916 T12G13	1-173	25-197	filler bp 117	290	28643	Deletion
					RB ok	1-178	26-203	Id. Nukl. 5 bp	173	28688
SPT/ GUS r 102 RB-RB IR Repeat	LB	BstYI	+	IV-AL049481 T5L19	1-292	29-320	Id. Nukl. 1 bp	292	10007	RB-RB
					RB-LB	Sequenzierungsqualität nicht ausreichend				

SPT/GUS r 106	LB	BstYI	+	V-AB016885 K19M22	filler bp 37	343	47154
	RB				weitere Analysen fehlen		
SPT/GUS f 108	LB	BstYI	+	V-AB019235 MMI9	filler bp 17	323	61432
	RB				weitere Analysen fehlen		
G/S/G r 114	LB	BstYI	+	I-AC036104 F16F4	Id. Nukl. 2 bp filler bp 25	293 107	21733 21754 21 bp
	Ti:RB						
G/S/G r 118	RB	BstYI	-	Ti Plasmid	152-580		
G/S/G r 119	RB	BstYI	+	V-AL391712 T5E8			
	LB Homologie:			IV-AF069442.1-T4I9-21.000			RB-RB
	LB-RB			keine Borderhomologie		6	20989 IR Repeat
G/S/G r 120	RB ok			1-39 148-187	Id. Nukl. 3 bp	35	14082 Translokation
	LB ok	BstYI	+	V-AB015472 MAE1	filler bp 13	38	11997 RB-RB
	RB Homologie:			V-AL162508.1-T7H20-800			IR Repeat
G/S/G r 125	RB-LB			keine Borderhomologie		2	799 Translokation
	LB ok	BstYI	+	V-AB015472 MAE1	filler bp 13	298	11997 Deletion
	RB ok			1-170 34-203	filler bp 54	224	12021 24 bp
G/S/G r 129	LB ok	BstYI	+	V-AB016876 MKM21	Id. Nukl. 1 bp	258	14576 Deletion
	RB ok			1-57 147-203	Id. Nukl. 2 bp	55	14596 20 bp
	LB Homologie:			III-AB024038			
G/S/G f 133	RB ok	BstYI	+	III-AB020749 MRC8	filler bp 11	41	57714 Deletion
	LB ok			1-30 282-311	filler bp 36	56	57733 29 bp
	RB ok			1-20 143-163			
GS/G f 136	LB ok	BstYI	+	V-AB013396 MIT20	Id. Nukl. 1 bp	279	20557 Deletion
	RB ok			1-146 26-171	Id. Nukl. 2 bp	144	20543 14 bp
	LB Homologie:			II-AC002505.2			
G/S/GFP f 126	RB ok	BstYI	+	V-AB013396 MIT20	filler bp 13	307	50109 Deletion
	LB ok	BclI	+	II-AC002505.2 section 148	Id. Nukl. 1 bp	28	58016 25 bp
	RB ok			1-179 26-204	Id. Nukl. 1 bp	179	51069 960 bp
G/S/GFP f 130	LB ok	BstYI	+	V-AB024024.1 K15C23	filler bp 4	141	57991 Deletion
	RB ok			1-29 286-314	Id. Nukl. 1 bp	28	58016 25 bp
	RB ok			1-137 37-173	filler bp 8	153	71433 24 bp
G/S/GFP f 130	LB ok	BstYI	+	V-AB024024.1 K15C23	Id. Nukl. 2 bp	276	71409 Deletion
	RB ok			1-145 53-197	filler bp 8	153	71433 24 bp
	LB Homologie:			II-AC002505.2			

G/S/GFP f 133	RB	BstYI +	I-AC007396.6 T4O12	LB Ti (PCR)						
				RB ok	1-137	32-168	filler bp 5	142	87773	Ti
G/S/GFP f 144	RB	BstYI +	IV-Z97336.1 Essa Icontig38	LB ok	1-297	30-324	filler bp 4	301	11225	Deletion
				RB ok	1-178	26-203	filler bp 40	218	11206	19 bp
G/S/GFP f 151	LB	BclI +	I-AC011765.6 F1M20	LB ok	2-45	286-329	filler bp 11	56	5054	
				RB Ti (PCR)						
G/S/GFP f 110	LB	BstYI +	II-AC002387.2 section 242	LB ok	1-299	29-327	filler bp 3	302	28870	Deletion
				RB ok	4-84	28-107	filler bp 78	162	28868	2 bp
G/S/GFP f 115	RB	BstYI +	I-AC007396.6 T4O12	LB ok	1-304	26-329	filler bp 13	317	69223	Deletion
				RB ok	1-150	44-193	filler bp 21	171	69218	5 bp
G/S/GFP f 126	RB	BstYI +	V-AL162751.1 F12E4	LB Ti (PCR)						
				RB ok	5-180	29-204	filler bp 11	191	25453	
G/S/GFP f 137	LB	BstYI +	I-AC004135 T17H7	LB ok	1-45	286-330	Id. Nukl. 2 bp	43	30694	
				RB Ti	1-59	147-205	bp 59-486; pCLD: 1027-1454			

Tabelle 6.4 Ermittlung von T-DNA Integrationen in *A. thaliana* anhand der durch iPCR ermittelten flankierender genomischen Bereiche

Abkürzungen: iPCR: inverse PCR; *Arab.*: *Arabidopsis thaliana*; LB: linke Grenze der T-DNA; RB: rechte Grenze der T-DNA; Nukl. Insert.: Nukleotid Insertion = Sequenzvergleich der erhaltenen Sequenz zur T-DNA bzw. *Arabidopsis*genom und die entsprechenden übereinstimmenden Sequenznukleotide; id. Nukl.: identische Nukleotide; Ti P.: Ti-Plasmid Sequenzen; pCLD = pCLD04541

Die erhaltenen iPCR Fragmente wurden entweder für den relativ zur T-DNA linken oder rechten flankierenden genomischen Bereich erhalten und sind durch LB bzw. RB gekennzeichnet. Diese wurden eluiert, aufgereinigt und sequenziert. Durch die BLAST (Atschul *et al.*, 1990) Analyse in der Datenbank TAIR bzw. NCBI wurde Homologie der Sequenzen zum *Arabidopsis*genom oder zu Ti-Plasmidsequenzen ermittelt. Die entsprechende GenBank Akzessionsnummer sowie das Chromosom, auf dem das Sequenzcontig liegt sind angegeben.

Die Bestätigung der relativ zur T-DNA rechten und linken flankierenden genomischen Bereiche erfolgte durch eine PCR mit Oligonukleotiden, die spezifisch für diesen genomischen Bereich sind. Die erhaltenen PCR Fragmente wurden eluiert, aufgereinigt und sequenziert. Sie wurden im Vergleich zu Bordersequenzen der T-DNA bzw. der genomischen Sequenz des Integrationsortes analysiert.

Angaben ist jeweils die der Sequenz der Transformante entsprechenden Nukleotide (=Nukl. Insertion T-DNA), die Homologie zu Bordersequenzen der T-DNA aufweisen und die Nukleotide der zum Vergleich verwendeten T-DNA Bordersequenzen (LB: 308-331 bzw. RB: 204-227), die die 24 bp direkten Sequenzwiederholungen der Endbereiche und angrenzende T-DNA Sequenzen enthalten.

Weiterhin ist die genomische Nukleotid Insertion anhand der erhaltenen Sequenz und des entsprechenden Integrationsortes angegeben, sowie die Art der Integration. Zusätzliche DNA (=filler) oder identische Nukleotide des Verbindungsbereich zwischen T-DNA und *Arabidopsis*-DNA wurden durch den Sequenzvergleich der Nukleotidinsertionen der T-DNA und der genomischen DNA ermittelt.

Die mit * markierten iPCR Fragmente wurden durch M. Gils (2000) erhalten und die mit " markierten durch D. Schubert (1999).

8 Anmerkungen

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen in 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 PD Dr. Klaus Palme betreut worden.

Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt ...

... Frau Dr. R. Schmidt für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen bei fachlichen Problemen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

... Herrn Dr. K. Palme für die Betreuung meiner Promotion.

... Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

... Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein für die bereitwillige Übernahme des Prüfungsvorsitz.

... allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe (Dr. Mario Gils, Daniel Schubert, Bertold Lechtenberg, Sandra Stegemann, Dr. Adile Acarkan, Dr. Mathias Roßberg, Oliver Clarenz, Rosa-Stella Mbulu, Karin Boivin und Russ Kalli) für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen kleinen Hilfestellungen im Laboralltag, die fachlichen Diskussionen und die konstruktive Kritik. Hervorzuheben ist die wertvolle Hilfe von Sandra Stegemann in der Gewebekultur und im Gewächshaus. Mein Dank geht weiterhin an Dörthe Müller und Karolyn Schmitz, die als Praktikantinnen in unserem Labor arbeiteten.

... den Gärtnern Frank Eickelmann, Andreas Lautscham und Insa Pitz (in der Reihenfolge ihres Erscheinens) für die Hilfe in der Pflanzenpflege.

... allen Mitgliedern der übrigen Arbeitsgruppen, besonders der Arbeitsgruppe Dr. B. Schulz, am Max-Delbrück-Laboratorium für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die konstruktive Kritik in vielen gemeinsamen Seminaren.

... meinen Eltern für ihr immerwährendes Verständnis und die selbstverständliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

... den „Masters“ und vielen mehr des TSV Bayer Dormagen und den DLRGlern der OG Korschenbroich für die Begleitung auf vielen geschwommenen Kilometern und ermutigende Gespräche in schwierigeren Zeiten.

... allen anderen in meinem „Wirkungskreis“ (besonders Dr. Andreas Steinert, Ellen Kremers, Nicole Bernstein, Sabine Forsbach, Matthias Elbe, Ulrike Rubröder, Andreas Möller) für moralische Unterstützung in schwierigeren Zeiten und die Erinnerung daran, daß es noch ein Leben nach dem Labor gibt.

Lebenslauf

Name, Vorname	Forsbach, Alexandra
Geburtsdatum	15.06.1974
Geburtsort	Ratingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	08/80-06/84 Gebrüder Grimm Grundschule Ratingen 08/84-06/90 Liebfrauen Realschule Ratingen 08/90-06/93 Lessing Gymnasium und Kollegschule Düsseldorf
Berufsausbildung	08/90-06/94 Lessing Gymnasium und Kollegschule Düsseldorf Staatlich geprüfte Technische Assistentin für Biologie (BTA)
Hochschulausbildung	09/93-12/97 Studium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 05/95 Zwischenprüfung Biologie 09/96 Zwischenprüfung Chemie 08/96-05/97 Staatsexamensarbeit in Biologie in der Arbeits- gruppe von HD Dr. U.A.O. Heinlein am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem Thema „Versuche zur subzellulären Lokalisation von Cyritestin“ 06/97-12/97 Erste Staatsprüfung für die Lehrämter der Sekundar- stufe II und I in Biologie und Pädagogik 04/98-04/00 Dissertation am Max-Delbrück-Laboratorium im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Arbeitsgruppe von Dr. Renate Schmidt

