

**Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von
Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing*
in *Arabidopsis thaliana***



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

**Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Ingo Hofmann
geb. am 21.07.1970 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter
 2. Prof. Dr. Claus Wasternack
 3. PD Dr. Ortrun Mittelsten Scheid

Halle (Saale), den 03.11.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000008467

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008467>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mechanismen der Inaktivierung	2
1.2	Biologische Funktion von TGS	3
1.3	DNA-Methylierung bei TGS	4
1.4	Einfluß von Transgenstruktur und Insertionsort auf TGS	6
1.5	Modellsysteme für TGS.....	7
1.6	Chromatinkomponenten mit Funktion bei TGS	11
1.7	Gegenstand der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Verwendete Materialien.....	14
2.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide	14
2.1.2	Pflanzenmaterial	14
2.1.3	Medien für die Kultur der Pflanzen	15
2.1.4	Mikroorganismen.....	15
2.1.5	Bakterielle Nährmedien	15
2.1.6	Vektoren.....	16
2.2	Angewandte Methoden	17
2.2.1	Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA	17
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	17
2.2.3	Isolation von RNA	18
2.2.4	Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	18
2.2.5	RT-PCR-Analysen	19
2.2.6	Agarosegelelektrophorese.....	19
2.2.7	<i>Nuclear Run-On</i> Transkription	20
2.2.8	Hybridisierungsexperimente.....	21
2.2.9	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.10	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.2.11	Anzucht des Pflanzenmaterials	23
2.2.12	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.13	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.2.14	Mutagenese von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.15	Kartierung der Mutationsorte.....	25
2.2.16	Nachweis von Luciferase, β -Glucuronidase und GFP.....	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Etablierung eines transgenen Testsystems für TGS	27
3.1.1	Herstellung der T-DNA-Konstrukte zur Induktion von TGS	27
3.1.2	Transformation und Selektion transgener Pflanzen.....	27

3.1.3	Untersuchung zur Expression der transgenen Reporter	28
3.1.3.1	Transgenexpression der Luciferaselinien	28
3.1.3.2	Transgenexpression der GUS-Linien	29
3.1.3.3	Transgenexpression der <i>GFP</i> -Linien	30
3.1.3.4	Auswahl geeigneter Linien für die Etablierung eines Testsystems.....	30
3.1.4	Charakterisierung der T-DNA-Insertionen der Luciferaselinien	32
3.1.5	Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation.....	34
3.1.6	Reaktivierung der Transgenexpression	36
3.1.7	DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten	37
3.2	Induktion und Selektion von Suppressormutanten für TGS	39
3.2.1	Mutagenese.....	39
3.2.2	Mutantenselektion	40
3.3	Charakterisierung der isolierten Suppressormutanten für TGS	41
3.3.1	Transgenexpression in den selektierten Mutanten	41
3.3.2	Kontrolle der T-DNA-Insertionen in den Mutantenlinien	43
3.3.3	DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten in den Mutanten	44
3.3.4	Segregation der Mutantenphänotypen nach Kreuzung	44
3.4	Kartierung der Mutationsorte	53
3.5	Identifizierung der Mutationsorte der allelen Mutanten 9/2/5 und 12/4/4	55
3.6	Komplementationsanalyse der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4.....	58
3.6.1	Expression von <i>TTG2</i> unter Kontrolle des endogenen Promotors.....	58
3.6.2	Untersuchung der Allelie der Mutanten 9/2/5, 12/4/4 und <i>ttg2-1</i>	60
3.7	Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1	60
3.8	Einfluß von <i>AtSUVH2</i> auf TGS	61
4	Diskussion	63
4.1	Etablierung eines neuen Testsystems zur genetischen Analyse von TGS	63
4.2	Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS	71
4.3	Kartierung der Mutationsorte der isolierten Mutanten.....	74
4.4	Untersuchungen an den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4	75
4.5	Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1	79
4.6	Der Einfluß von <i>AtSUVH2</i> auf TGS	80
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literatur.....	84
7	Anhang	96
7.1	Herstellung der Expressionskassetten	96
7.2	Modifizierung des Vektors pGPTV-KAN	96
7.3	Herstellung der T-DNA-Konstrukte.....	97
7.4	Verwendete molekulare Marker	100
7.5	Primer für Klonierung und Sequenzierung	102

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid	min	Minuten
Abb.	Abbildung	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonat
Amp ^r	Ampicillinresistenz	mRNA	<i>messenger</i> RNA
ATPase	Adenosintriphosphatase	MS	Murashige und Skoog
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	M _(x)	Generation nach Mutagenese
BAP	Benzylaminopurin	N	Aminosäure Asparagin
BAR	Basta-Resistenz; Phosphinothricinacetyltransferase	N	eines der Nucleotide A, C oder T
bp	Basenpaar	<i>NPT II</i>	Neomycinphosphotransferase
bzw.	beziehungsweise	N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
C	Cytosin-Nukleotid	OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
°C	Grad Celsius	p	Phosphat
ca.	zirka	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	PEV	Positionseffektvariegation
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	Poly-A	Polyadenylierung
CHS	Chalconsynthase	PTGS	<i>Post Transcriptional Gene Silencing</i>
Ci	Curie	Q	Aminosäure Glutamin
CTP	Cytidintriphosphat	R	Aminosäure Arginin
dATP	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heißt	RNase	Ribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid	rRNA	ribosomale RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Upm	Umdrehungen pro Minute
DNase	Desoxyribonuklease	RT	<i>Reverse</i> Transkription
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat	s.	siehe
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
EMS	Ethylmethansulfonat	siRNA	<i>small interfering</i> RNA
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere	SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
F _(x)	Generation nach Kreuzung (Filialgeneration)	SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
g	Gravitationskonstante	SUVH _(x)	<i>SU(VAR)3-9</i> -Homolog
G	Guanin-Nukleotid	T	Aminosäure Threonin
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>	T	Thymin-Nukleotid
GTP	Guanosintriphosphat	Tab.	Tabelle
GUS	β -Glucuronidase	T-DNA	Transfer-DNA
h	Stunden	TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat	TMV	Tabakmosaikvirus
<i>HPT</i>	Hygromycinphosphotransferase	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
H3K9	Histon H3 Lysin 9 (Methylierung)	T _(x)	Generation nach Transformation
i.a.	im allgemeinen	U	<i>Units</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid	u.a.	unter anderem
K	Aminosäure Lysin	UTP	Uridintriphosphat
Kan ^r	Kanamycinresistenz	UV	ultraviolett
Kap.	Kapitel	W	Aminosäure Tryptophan
kb	Kilobasenpaare	w/v	Masse je Volumen
L	<i>Layer</i> ; Zellschicht	WT	Wildtyp
<i>LacZα</i>	α -Untereinheit der β -Galactosidase	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
LB	Luria Bertani	X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>	Y	Aminosäure Tyrosin
LUC	Luciferase	z.B.	zum Beispiel
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonat	z.T.	zum Teil
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>		

1 Einleitung

Die Entdeckung und Etablierung von Methoden zur Übertragung von Erbmaterial auf Pflanzen hat einigen Wissenschafts- und Wirtschaftsgebieten zuvor ungeahnte Möglichkeiten eröffnet. Voraussetzung für den Einsatz transgener Pflanzen in Wissenschaft und Praxis ist eine über viele Generationen stabile und starke Expression des Transgens. In vielen Fällen wurden jedoch bei Untersuchungen zur Expression und Vererbung von Transgenen Abweichungen von dem zu erwartenden Erbgang beobachtet (Deroles und Gardner 1988). Neben Transformanten, die einen vollständigen Verlust der Expression zeigten, wurden Pflanzen mit unterschiedlich starker Transgenaktivität erhalten und Aufspaltungsverhältnisse gefunden, die nicht den Mendelschen Gesetzen folgten. Umfangreiche Untersuchungen zur Segregation transgener Selektionsmarker haben gezeigt, daß bei Tabak 8 bis 36 % (Heberle-Bors *et al.* 1988, Topping *et al.* 1991) und bei *Arabidopsis thaliana* 10 bis 50 % (Schmidt und Willmitzer 1988, Mittelsten Scheid *et al.* 1991) der Primärtransformanten das Transgen phänotypisch nicht entsprechend den Mendelschen Gesetzen vererben. Meist wurde bei Pflanzen mit solchen phänotypisch abweichenden Vererbungsmustern eine teilweise oder vollständige Inaktivierung des eingebrachten Transgens festgestellt. Die Inaktivierung erfolgt nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz des Transgens, sondern durch epigenetische Mechanismen, die sich in vielen Fällen durch lokale Modifikationen der Chromatinstruktur manifestieren. Für diesen Prozeß der Inaktivierung eingebrachter Transgene und deren eventuell vorhandener endogener Homologe wurde der Begriff *Gene Silencing* geprägt.

Gene Silencing als Ursache für eine mangelhafte Vorhersagbarkeit und Reproduzierbarkeit der Transgenexpression stellt eines der Hauptprobleme bei der Erzeugung und Nutzung transgener Pflanzen dar. Deshalb ist es von enormer Bedeutung, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieses Phänomens beteiligten Mechanismen besser zu verstehen. Darüber hinaus steht *Silencing* als funktionelle Basis für epigenetische Regulationsphänomene auch im Brennpunkt des Interesses der Grundlagenforschung, da eine Vielzahl entwicklungsbiologischer Prozesse über chromatinvermittelte Regulationsmechanismen kontrolliert wird. Ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis dieses Phänomens ist die Identifizierung der an der Entstehung und Aufrechterhaltung von *Silencing* beteiligten funktionellen Komponenten. Ein geeigneter Weg für die Suche nach solchen Komponenten ist die

Isolation von Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, *Silencing* vollständig auszubilden. Die Isolation von Mutanten setzt jedoch die Verfügbarkeit eines geeigneten funktionellen Testsystems bei Pflanzen voraus. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ein transgenes *Silencing*-Testsystem etabliert werden, mit dem die Isolation von *Silencing*-Suppressormutanten möglich ist. Die erhaltenen Mutanten können zur Identifizierung von Proteinen führen, die an der Etablierung und Regulation von *Silencing*-vermittelnden, epigenetisch aktiven Chromatinstrukturen beteiligt sind und würden dadurch zum besseren Verständnis des Phänomens *Silencing* beitragen.

1.1 Mechanismen der Inaktivierung

Generell kann zwischen zwei verschiedenen Wegen unterschieden werden, die zur Inaktivierung eines Transgens führen. Erfolgt die Inaktivierung durch Unterbinden der Transkription des Gens, spricht man von *Transcriptional Gene Silencing* (TGS). Bei TGS sind die inaktivierten Loci durch charakteristische lokale Modifikationen des Chromatins, wie DNA-Hypermethylierung, Histondeacetylierung, Histonmethylierung und erhöhte Proteinbeladung der DNA gekennzeichnet (zusammengefaßt bei Meyer 2000). Transkriptionell inaktiviert werden bevorzugt solche Gene, die in Form zahlreicher Kopien vorliegen und sich im Genom in räumlicher Nähe befinden. Somit ist TGS i.a. eine Folge von direkten oder invertierten Sequenzwiederholungen. Aus diesem Grund werden für TGS auch oft die Begriffe Homologie-abhängige Geninaktivierung (*homology dependent gene silencing*) und *Repeat*-induzierte Geninaktivierung (*repeat induced gene silencing*) verwendet (Meyer und Saedler 1996, Ye und Signer 1996).

Wird im Gegensatz zu TGS die Inaktivierung nicht durch Transkriptionsregulation, sondern durch schnellen Abbau der transkribierten mRNA realisiert, wird von *Post-transcriptional Gene Silencing* (PTGS) gesprochen (Stam *et al.* 1997). Somit gehört PTGS in Pflanzen, wie *RNA Interference* in Tieren und *Quelling* in Pilzen zu den RNA-vermittelten *Silencing*-Systemen (Fagard *et al.* 2000). Bei der Induktion von PTGS wird von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) der zur Ziel-mRNA komplementäre Strang synthetisiert, so daß doppelsträngige RNA (dsRNA) entsteht, die von einem Ribonuklease III-Enzym (*DICER*) in Bruchstücke von 21 bis 24 Nukleotide zerschnitten wird (Lipardi *et al.* 2001, Bernstein *et al.* 2001, Hamilton und Baulcombe

1999). Diese siRNAs (*small interfering RNA*) vermitteln die gezielte Eliminierung der homologen mRNAs (Sijen *et al.* 2001). Über Wechselwirkung mit Regionen von siRNA-DNA Sequenzidentität kommt es meist zur RNA-induzierten DNA-Methylierung, die jedoch allein keine wesentliche Reduktion der Transkription bewirkt (Jones *et al.* 1999, Matzke *et al.* 2001). In einigen Fällen wird das Inaktivierungssignal in Form der siRNA von Zelle zu Zelle und systemisch durch das Phloem in andere Bereiche der Pflanzen übertragen (Fagard und Vaucheret 2000, Mallory *et al.* 2003).

Neben der sowohl bei transkriptionellem als auch bei posttranskriptionellem *Silencing* auftretenden DNA-Hypermethylierung sind beide Inaktivierungsarten über zahlreiche weitere gemeinsame Proteinkomponenten miteinander verknüpft. So beeinflussen TGS-Suppressormutanten in den pflanzlichen Chromatingenen *DDMI* und *MET1* in gleicher Weise auch PTGS (Morel *et al.* 2000), und Proteine aus der Familie der *Argonaute* (*AGO*) sind sowohl an Histon- und DNA-Methylierung als auch an RNA-vermitteltem *Silencing* beteiligt (Zilberman *et al.* 2003).

Unabhängig vom Mechanismus der Inaktivierung wird der Inaktivierungsstatus innerhalb einer Pflanze stabil über die mitotischen Zellteilungen weitergegeben. TGS wird auch über die Meiose stabil von einer Generation auf die nächste übertragen, während PTGS in jeder neuen Generation erst nach dem Überschreiten eines bestimmten mRNA-Schwellenwertes erneut initiiert wird (Depicker und Van Montagu 1997, Finnegan *et al.* 1998).

1.2 Biologische Funktion von TGS

Die DNA als Träger der primären Erbinformation der Zelle ist in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet, die die Position und Zugänglichkeit individueller Sequenzen, Gene und Regionen kontrolliert. Eine Vielzahl von Untersuchungen an genetischen Modellsystemen wie Hefe und *Drosophila* führten zu der Erkenntnis, daß die räumliche und zeitliche Expression bestimmter Gene in entscheidendem Maße über Veränderungen der Chromatinstruktur der entsprechenden DNA-Domänen reguliert wird. Darüber hinaus sind Veränderungen im Verpackungsgrad bestimmter DNA-Abschnitte entscheidend für die Erstellung und Weitergabe determinierter epigenetischer Programme von einer Zellgeneration auf die nächste (Paro 1993). Die in allen eukaryotischen Organismen weitgehend funktionell konservierten Mechanismen zur Regulation der Chromatinstruktur sind u. a. für die korrekte Funktion der

Centromere und Telomere sowie die Segregation der Chromosomen während der Zellteilung erforderlich. Durch Veränderungen des Chromatins wird auch die entwicklungspezifische Expression homeotischer Gene, X-Chromosomen-Inaktivierung, *Imprinting*, *Nucleolar Dominance* und transkriptionelle Inaktivierung der *Mating-Type* Loci in Hefe vermittelt. Die an der Regulation dieser Phänomene beteiligten Komponenten sind in funktionell gleicher Weise auch für die Entstehung und Kontrolle von *Transcriptional Gene Silencing* (TGS) verantwortlich. Durch die Fähigkeit zur transkriptionellen Inaktivierung repetitiver Sequenzen wird in eukaryotischen Genomen die übermäßige Ausbreitung fremder DNA, wie z. B. transponible Elemente, Retroviren und eingebrachte Transgene (T-DNAs), verhindert (Martienssen 1998, Matzke und Matzke 1998). Die Stilllegung anderer endogener, nicht-transponibler *Repeats* war wahrscheinlich ursprünglich nur eine simple Nebenwirkung dieser Abwehrreaktion gegen fremde DNA, aus der sich dann weitere chromatinvermittelt regulierte Funktionen entwickelt haben. Somit stellt TGS eine stabile, jedoch potentiell reversible epigenetische Veränderung dar, die als Folge einer normalen Entwicklung der Organismen vorkommt und als entwicklungsbiologischer Prozeß die funktionelle Grundlage für chromatinvermittelte Regulationsphänomene bildet.

1.3 DNA-Methylierung bei TGS

Methylierung ist eine bei vielen Organismen beobachtete Veränderung der DNA, die eine bedeutende Rolle bei *Gene Silencing* und Heterochromatisierung spielt (Richards und Elgin 2002). TGS ist immer mit einer erheblichen Methylierung der DNA des inaktivierten Locus verbunden. Dabei korreliert die Stärke der Inaktivierung mit einer zunehmenden DNA-Methylierung des Transgens (Hobbs *et al.* 1990, Linn *et al.* 1990). Wenn nahezu alle Cytosinbasen eines Locus methyliert sind, wird von DNA-Hypermethylierung gesprochen.

Bei der DNA-Methylierung werden die Nukleotidbasen Cytosin und Adenin der DNA durch Methylierung oder Hydroximethylierung enzymatisch modifiziert. Das Wissen über die Funktion der Adeninmethylierung (6N-Methyladenin) ist noch gering. Bisher wurde auch kein Zusammenhang zwischen Adeninmethylierung und *Silencing* nachgewiesen. Deshalb wird unter dem Begriff DNA-Methylierung i.a. nur die Methylierung von Cytosin in Position 5 des Pyrimidinringes (5-Methylcytosin)

verstanden, für die in letzter Zeit einige funktionelle und regulatorische Mechanismen in pflanzlichen und tierischen Zellen aufgeklärt wurden. Dabei hat sich gezeigt, daß die Cytosinbasen z.T. ohne einen bestimmten Sequenzkontext (asymmetrisch bzw. nicht-palindrom), jedoch meist spezifisch in den palindromen Sequenzmotiven CpG und CpNpG (N=A, C oder T) methyliert bzw. demethyliert werden (Bhattacharya *et al.* 1999, Lindroth *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002). Bei Säugetieren ist die DNA-Methylierung weitgehend auf das Motiv CpG begrenzt (Ramsahoye *et al.* 2000). In pflanzlichen Genomen werden zusätzlich das Motiv CpNpG sowie in erheblichem Maß auch asymmetrische Cytosine methyliert (Meyer *et al.* 1994, Jacobson und Meyerowitz 1997). Eine starke asymmetrische Methylierung wird auch im Genom einiger Pilze gefunden (Selker *et al.* 1993, Goyon *et al.* 1994). Die Methylierung symmetrischer Cytosine ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Erhaltung determinierter Methylierungsmuster über die DNA-Replikation. In Säugetieren konnte gezeigt werden, daß die nach der Replikation entstehenden hemimethylierten Sequenzen ein bevorzugtes Substrat für die DNA-Methyltransferase *DNMT1* sind, die die symmetrischen Cytosine des neu synthetisierten DNA-Stranges methyliert (Bestor *et al.* 1988).

In *Arabidopsis thaliana* sind mindestens drei Klassen von DNA-Methyltransferasen für die Erhaltung der Methylierungsmuster erforderlich (Finnegan und Kovac 2000). *MET1* (Methyltransferase 1) bildet eine Klasse mit der höchsten Sequenz- und Funktionshomologie zu der in Säugetierzellen essentiellen Methyltransferase *DNMT1* (Finnegan und Dennis 1993). *MET1*-Mutanten fehlt weitgehend die Methylierung des Motivs CpG. Sie zeigen zahlreiche phänotypische Abnormalitäten, die sich von Generation zu Generation verstärken (Finnegan *et al.* 1996). Eine weitere Klasse von Methyltransferasen bilden die neben der Methyltransferase-Domäne eine Chromo-Domäne enthaltenden Chromomethylasen (Henikoff und Comai 1998). Der wichtigste Vertreter dieser für das Pflanzenreich spezifischen Klasse ist *CMT3* (Chromomethylase 3). Der Chromo-Domäne, die eine für Chromatin-Proteine spezifische Interaktionsdomäne darstellt, wird eine Funktion bei RNA-Protein-Interaktionen (Akhtar *et al.* 2000) und der Bindung an Chromatinkomponenten (Jackson *et al.* 2002) zugeschrieben. *CMT3*-Mutanten fehlt genomweit die Methylierung im Motiv CpNpG, und die asymmetrische Methylierung ist an einigen Loci reduziert (Bartee *et al.* 2001). Die dritte Klasse von Methyltransferasen in *Arabidopsis thaliana* bilden *DRM1* und *DRM2* (*domains rearranged methylase*). Die katalytische Domäne der *DRMs* zeigt Sequenzhomologie zur Familie der tierischen Methyltransferasen *DNMT3*, die eine bedeutende Klasse von *de novo*-Methyltransferasen bilden (Cao *et al.* 2000). In

Arabidopsis sind *DRM1* und *DRM2* für die initiale Etablierung der Methylierung in allen beschriebenen Sequenzmotiven (CpG, CpNpG und nichtpalindrome Motive) und die Erhaltung der asymmetrischen Methylierung erforderlich [Cao und Jacobsen 2002(a), Cao und Jacobson 2002(b)]. *DRMs* sind somit nur zur Initiation, jedoch nicht zur Aufrechterhaltung von *Silencing* erforderlich, während zuvor inaktivierte Loci in *MET1*- und *CMT3*-Mutanten weitgehend reaktiviert werden.

1.4 Einfluß von Transgenstruktur und Insertionsort auf TGS

Die Fähigkeit zur Induktion von TGS und die Stärke der Inaktivierung wird von der genomischen bzw. chromosomalen Position des Insertionsortes und der Struktur des inserierten Locus bestimmt. Ursächlich für ersteres ist die Tatsache, daß die Chromosomen der meisten höheren Eukaryoten aus charakteristischen Regionen aufgebaut sind, die sich hinsichtlich des Kondensationsgrades unterscheiden. Erfolgt in *Drosophila* oder Hefe der Einbau eines Transgens in oder in der Nähe von heterochromatischen Bereichen, wie Centromer- oder Telomerregionen, wird dieses Transgen i.a. zellklonal oder vollständig inaktiviert (Dorer und Henikoff 1994). Die Inaktivierungsentscheidung wird während der Embryonalentwicklung in jeder Zelle autonom getroffen und zellklonal weitergegeben, so daß phänotypisch eine variegierende Genexpression beobachtet wird. Dieses unter dem Begriff Positioneffektvariegation (PEV) bekannte Phänomen wurde im Ergebnis zahlreicher Untersuchungen beschrieben (Spofford 1976, Reuter und Spierer 1992, Tartof 1994) und hat sich als ein sehr nützliches *in vivo*-Testsystem für die Entstehung und Regulation von Heterochromatin erwiesen (Grigliatti 1991). In Pflanzen steht kein PEV-System zur Verfügung. In zwei weit zurückliegenden Untersuchungen wurde von variegierender Genexpression in *Oenothera lamarckiana* im Zusammenhang mit Translokationen nach Röntgenstrahlmutagenese berichtet (Catcheside 1938 und 1949). Es wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen variegierender Genexpression und heterochromatischer Lokalisierung nachgewiesen. Gegen einen bedeutenden Einfluß von Positionseffekten auf die Genexpression in Pflanzen spricht die Beobachtung, daß z.B. in Mais einzelne transkriptionell aktive Gene innerhalb großer Blöcke hochrepetitiver, hypermethylierter DNA lokalisiert sind (SanMiguel *et al.* 1996; Tikhonov *et al.* 1999). Auch Untersuchungen zur Expression transgener Reporter nach zufälliger Integration in pflanzliche Genome geben Anlaß zu der Vermutung, daß in

Pflanzen, im Vergleich mit *Drosophila*, die Abhängigkeit der Genexpression vom Insertionsort deutlich geringer ist (Schubert 2002). Eine wesentlich stärkere Rolle spielt in Pflanzen die Struktur der inserierten Sequenz, da vor allem solche Gene inaktiviert werden, die am gleichen Locus in Form mehrerer Kopien vorliegen. Die Anzahl der inserierten Genkopien und damit die Architektur des Insertionsortes wird u.a. von der verwendeten Transformationsmethode beeinflusst. So kann bei Agrobakterienvermitteltem Gentransfer in erheblichem Umfang das Auftreten von gekoppelten Mehrfachinsertionen (Tandeminsertionen) der transformierten T-DNA beobachtet werden (De Buck *et al.* 1999). Die dadurch entstehenden direkten und invertierten Sequenzwiederholungen sind in Pflanzen ein bevorzugtes Ziel für TGS (Assaad *et al.* 1993, Matzke *et al.* 1994, Mittelsten Scheid *et al.* 1991). Auch in *Drosophila melanogaster* werden gekoppelte p-Element-Mehrfachinsertionen mit dem *WHITE*-Reporter gen transkriptionell inaktiviert (Dorer und Henikoff 1994). Hier konnte gezeigt werden, daß neben der Anzahl der Sequenzwiederholungen vor allem ihre Orientierung zueinander entscheidend für den Grad der Inaktivierung ist. Invertierte Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) sind erheblich stärker von *Silencing* betroffen als Sequenzen mit gleicher Orientierung (*direct repeats*). Als Schlußfolgerung u.a. aus dieser Beobachtung wurde ein Modell entwickelt, wonach TGS dann auftritt, wenn durch Paarung homologer Sequenzmotive die Bildung von Haarnadel- bzw. Schleifen-Strukturen möglich ist (Dorer und Henikoff 1994). Diese durch die Paarung entstehenden Motive induzieren eine Heterochromatisierung der repetitiven Sequenzen des betreffenden Locus, indem sie die Bindung spezifischer Chromatinkomponenten ermöglichen. Unterschiede im Niveau der Inaktivierung reflektieren die relative Stabilität der gebildeten Strukturen. Im Fall von invertierten Duplikationen ist die Haarnadel- bzw. Schleifenstruktur stabiler, während bei direkten Duplikationen der ungepaarte Zustand überwiegt. Je mehr *Repeats* an einem Locus existieren, desto wahrscheinlicher ist die Bildung von Sequenzpaarungen. Somit ist dieses Modell in der Lage, die Zusammenhänge zwischen Anzahl und Anordnung der Sequenzwiederholungen und der jeweils beobachteten Stärke der Inaktivierung zu erklären.

1.5 Modellsysteme für TGS

Das *Drosophila*-Positioneffektvariegations (PEV)-System ist das am längsten bekannte (Muller 1930) und wahrscheinlich auch sensitivste TGS-Modellsystem. Bei der

ursprünglich beschriebenen Variante dieses Systems ist, infolge von Chromosomenbrüchen und anschließender Umordnung der Fragmente, das zuvor im Euchromatin lokalisierte *WHITE*-Gen in die Nähe eines Blocks centromernahen Heterochromatins verlagert (Schultz 1936). Als Folge sind die normalerweise roten Augen des Wildtyps in der Mutante rot-weiß gefleckt, d.h. die Expression des *WHITE*-Genes variiert (variiert) zellklonal. Mit dem *Drosophila*-PEV-System sind bereits Dosisunterschiede vieler Chromatinproteine nachweisbar, wie sie z.B. bei Mutanten im heterozygoten Zustand (*Haplo*-Suppressor-Effekt) oder nach Einbringen einer zusätzlichen Genkopie (*Triplo*-Enhancer-Effekt) auftreten (Wustmann *et al.* 1989). Diese von *Drosophila* bekannten Effekte können mit keinem der bisher in Pflanzen etablierten TGS-Modellsysteme beobachtet werden. Ob die Ursache hierfür allein in einer zu niedrigen Sensitivität der pflanzlichen *Silencing*-Systeme liegt, oder Dosisunterschiede von Chromatinkomponenten in Pflanzen besser kompensiert werden, ist ungeklärt.

Pflanzliche TGS-Systeme konnten erst mit der Entwicklung von Methoden zur Übertragung von DNA auf Pflanzenzellen etabliert werden, da zuvor keine dem *Drosophila*-PEV-System vergleichbaren *Silencing*-Phänomene beobachtet wurden. Ausnahmen hierzu bilden die bereits erwähnte variiierende Genexpression bei *Oenothera* (siehe Kap. 1.3) und das in Pflanzen dokumentierte Phänomen der Paramutation (zusammengefaßt bei Brink 1973). Bei Paramutanten wird ein "paramutierbares" Allel in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines "paramutagenen" Allels auf dem homologen Chromosom epigenetisch reguliert bzw. inaktiviert (Assaad *et al.* 1993). In den meisten Fällen blieb jedoch die molekulare Ursache der beobachteten Veränderungen ungeklärt.

Mit der Möglichkeit zur Erzeugung transgener Pflanzen offenbarten sich in fast allen verwendeten Systemen *Silencing*-Phänomene (Jones *et al.* 1987, Matzke *et al.* 1989, Hobbs *et al.* 1990, Mittelsten Scheid 1991). Assaad und Signer (1992) etablierten in *Arabidopsis* ein *Silencing*-System, das auf einer Einzelinsertion einer T-DNA basiert, die neben einem funktionellen *HPT*-Gen (Hygromycinphosphotransferase) zwei verschiedene, nicht funktionelle *NPT*-Mutantenallele (Neomycinphosphotransferase) trägt. Die *NPT*-Mutantenallele unterscheiden sich dabei durch je eine nicht überlappende Deletion. Aus den Nachkommen dieser Linie wurden Pflanzen selektiert, bei denen in Folge von Rekombinationsereignissen zwischen den beiden *NPT*-Mutanten eine funktionelle *NPT*-Resistenz entstanden war. Analysen zur Struktur der rekombinierten T-DNA-Insertionen haben gezeigt, daß nur dann eine Inaktivierung des

Transgens auftritt, wenn sequenzhomologe Bereiche vorhanden sind (Assaad *et al.* 1993). Der bedeutende Vorteil dieses *Silencing*-Systems war, daß die verschiedenen, durch Rekombination entstandenen Konstrukte am gleichen genomischen Locus vorlagen, so daß direkte Untersuchungen der Transgenexpression in Abhängigkeit von der T-DNA-Struktur möglich waren. Im gleichen System konnte gezeigt werden, daß RIGS (*repeat induced gene silencing*) durch das Fehlen von *run-on*-Transkripten der inaktivierten Gene gekennzeichnet ist und die betroffenen Loci eine erhöhte Resistenz gegen Nukleasen aufweisen (Ye und Signer 1996).

Ein ähnliches transgenes *Silencing*-System wurde von Mittelsten Scheid *et al.* (1998) zur Isolation erster Suppressormutanten für TGS genutzt. Als *Silencing*-Reportersystem diente eine Linie von *Arabidopsis thaliana*, die einen Locus mit zahlreichen Kopien des Hygromycinphosphotransferase-Transgens (*HPT*) trägt. Diese Linie zeigt infolge der repetitiven Anordnung eine über mehrere Generationen stabile transkriptionelle Inaktivierung des Reportergens und somit Sensitivität gegen Hygromycin (Mittelsten Scheid *et al.* 1996). Nach Mutagenese mit EMS (Ethylmethansulfonat) bzw. schnellen Neutronen konnten aus der M2-Generation 8 Mutanten [*som1 - som8* (*som* für *somniferous*)] selektiert werden, die eine Reaktivierung der Hygromycinresistenz aufwiesen. Mindestens 5 dieser Mutanten (*som1*, 4, 5, 7 und 8) wurden als *ddm1*-Allele identifiziert (Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Jeddelloh *et al.* 1999). Bei einem zweiten Mutanten-Screen gelang nach T-DNA-Mutagenese mit Hilfe des beschriebenen *Silencing*-Systems die Isolation einer weiteren TGS-Suppressor-Mutante [*mom1* (*mom* für *Morpheus' molecule*)] (Amedeo *et al.* 2000).

Ein weiterer Mutanten-Screen wurde in einem aus drei verschiedenen transgenen Markergenen bestehenden *Silencing*-System durchgeführt. Die in diesem System verwendeten transgenen Marker Hygromycinphosphotransferase (*HPT*), Neomycinphosphotransferase (*NPT*) und Chalconsynthase (*CHS*) sind inklusive der für die Anthocyan-Produktion erforderlichen endogenen *CHS*-Kopie wiederum infolge komplexer Mehrfachinsertionen inaktiviert (Davies *et al.* 1997). Nach EMS- bzw. Röntgenstrahl-Mutagenese konnten zwei Mutanten [*sil1* und *sil2* (*sil* für *modifiers of silencing*)] mit reaktivierter Kanamycinresistenz und eine Mutante [*hog1* (*hog* für *homology dependent gene silencing*)] mit reaktivierter bzw. erhöhter *CHS*-Aktivität isoliert werden (Furner *et al.* 1998). Die von den Mutationen betroffenen Gene wurden bisher nicht identifiziert.

Ein sehr effizientes, nicht-transgenes TGS-System bilden die CLARK KENT (*CLK*)-Mutanten. CLARK KENT-Mutanten sind epigenetische Allele (Epi-Mutanten) des

Arabidopsis-SUPERMAN (*SUP*)-Locus, die durch Inaktivierung und Hypermethylierung der *SUP*-Gene gekennzeichnet sind (Jacobson und Meyerowitz 1997). Das spontane Auftreten von *CLK*-Mutanten wird häufig in *MET1*-Antisense-Linien sowie *MET1*- und *DDMI*-Mutanten beobachtet, deren DNA ansonsten genomweit hypomethyliert ist. Die Ursache für das Auftreten dieser Epi-Mutanten ist nicht bekannt (Lindroth *et al.* 2001). Phänotypisch sind die Mutanten durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet (Jacobson und Meyerowitz 1997). Die *CLK*-Mutanten sind im Gegensatz zu transgenen TGS-Systemen rezessiv. Der Mutantenphänotyp ist erblich, jedoch nicht dauerhaft stabil. Zur Nutzung als TGS-Modellsystem wurde aus diesem Grund eine zusätzliche Kopie des *SUP*-Locus transgen eingebracht (Lindroth *et al.* 2001). Das so erhaltene stabilisierte CLARK KENT -Allel (*clk-st*) wurde in einem EMS-Mutageneseexperiment zur Isolation von Mutanten mit reaktivierter *SUP*-Genexpression genutzt. Im Ergebnis wurden Mutationen in den Genen *CMT3* (Chromomethylase 3) (Lindroth *et al.* 2001), *KYP* (KRYPTONITE) (Jackson *et al.* 2002) und *AGO4* (ARGONAUTE 4) (Zilberman *et al.* 2003) identifiziert, von denen zuvor nicht bekannt war, daß sie TGS modifizieren.

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, daß auch in Hefen Phänomene ähnlich der aus *Drosophila* bekannten Positionseffektvariegation auftreten, die sich ebenfalls in Form variegierender Phänotypen manifestieren. Beschrieben wurde variegierende Expression von Genen sowohl in centromernahen Bereichen bei *Schizosaccharomyces pombe* (Allshire *et al.* 1994) als auch Telomerpositionseffekte bei *Saccharomyces cerevisiae* (Gottschling *et al.* 1990). Darüber hinaus treten in *Saccharomyces cerevisiae* auch nicht-variegierende *Silencing*-Phänomene wie die transkriptionelle Inaktivierung von Genen der *Mating-Type*-Loci und rRNA-*Silencing* auf (Grunstein 1998). Mit Hilfe von *Silencing*-Systemen in Hefen, die meist auf Telomerpositionseffektvariegation basieren, wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Produkte als Suppressor oder *Enhancer* auf TGS wirken (Ayoub *et al.* 2003, Boudreault *et al.* 2003, Pidoux *et al.* 2003). Einige dieser Proteine sind Hefe-Homologe bekannter *Drosophila*-PEV-Modifikatoren, während andere neue, zuvor unbekannte Chromatinproteine darstellen. TGS-Systeme in Hefen sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität und einfachen Handhabbarkeit eine wichtige Ergänzung der tierischen und pflanzlichen Systeme und werden deshalb auch oft zur funktionellen Analyse von in heterologen Systemen identifizierten Chromatinkomponenten verwendet (Laible *et al.* 1997, Ishii und Laemmli 2003).

1.6 Chromatinkomponenten mit Funktion bei TGS

Sehr erfolgreich gelang die Identifizierung und Charakterisierung von Chromatinkomponenten mit Suppressor- oder *Enhancer*-Effekt auf TGS mit Hilfe des PEV-Systems in *Drosophila*. Diese zahlreich isolierten, z.T. dosisabhängig wirkenden Heterochromatin-Komponenten und Heterochromatin-modifizierenden Faktoren werden entsprechend ihrer Wirkung auf PEV als *SU(VAR)* (*Suppressor of Variegation*) bzw. *E(VAR)* (*Enhancer of Variegation*) bezeichnet (Grigliatti 1991). Wichtige *Drosophila*-PEV-Suppressoren, zu denen auch strukturell und funktionell konservierte pflanzliche Homologe in *Arabidopsis* gefunden wurden, sind unter anderem Chromatinproteine wie *HPI* (Heterochromatinprotein 1) (Eissenberg *et al.* 1990) und *SU(VAR)3-9* (Tschiersch *et al.* 1994). *SU(VAR)3-9* ist ein SET-Domänen-Protein und der namensgebende Vertreter einer Klasse von Histon H3 Lysin 9 (H3K9) - Methyltransferasen (Schotta *et al.* 2002). *HPI* wiederum bindet mit seiner Chromo-Domäne spezifisch an Lysin 9-methyliertes Histon H3. Diese Bindung ist essentiell für die Bildung von Heterochromatin (Lachner *et al.* 2001, Bannister *et al.* 2001). Aufgrund dieser Zusammenhänge und der evolutionären Konservierung der strukturellen und funktionellen Motive wird diesen Chromatinkomponenten eine Schlüsselfunktion bei der Bildung von Heterochromatin zugeschrieben.

In Pflanzen können alle TGS-modifizierenden Komponenten bzw. deren Mutanten zunächst generell hinsichtlich ihres Einflusses auf die DNA-Methylierung unterschieden werden (Amedeo *et al.* 2000). Zu den in *Arabidopsis* bekannten TGS-Suppressormutanten, bei denen eine Reduzierung der DNA-Methylierung gefunden wird, gehören zunächst die bereits erwähnten Mutanten in den Methyltransferasen *MET1*, *CMT3*, *DRM1* und *DRM2*. Weitere Mutanten, die, obwohl sie nicht für DNA-Methyltransferasen kodieren, eine Reduzierung der DNA-Methylierung hervorrufen, sind *ddm1* (*decreased DNA methylation*) (Vongs *et al.* 1993), *kyp* (KRYPTONITE) (Jackson *et al.* 2002) und *ago4* (ARGONAUTE 4) (Zilberman *et al.* 2003). Der einzige bisher identifizierte Vertreter von TGS-Suppressormutanten ohne Veränderung der DNA-Methylierung ist *mom* (Amedeo *et al.* 2000). *MOM* kodiert für ein neuartiges, chromatinassoziiertes Kernprotein mit repetitiven Domänen und nur kurzen Regionen mit Homologie zu bekannten Proteinen.

DDM1 ist ein Mitglied der *SNF2*-Familie DNA-abhängiger ATPasen und kodiert für ein *SWI2/SNF2*-ähnliches Protein (Jeddeloh *et al.* 1999). Der *SWI/SNF*-Komplex wurde ursprünglich in Hefe identifiziert, spielt dort eine Rolle beim *mating type switch* (*SWI*

für *switch-independent*) und ist involviert in die transkriptionelle Regulation der Glukose-Repression (*SNF* für *sucrose non-fermenting*) (Winston und Carlson 1992). Bei Säugetieren ist der Komplex an transkriptionellen Aktivierungsprozessen und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Kingston *et al.* 1996). Mutanten in *DDMI* fehlt, im Vergleich mit dem Wildtyp, genomweit ca. 70 % der DNA-Methylierung in allen beschriebenen Motiven, obwohl in den Mutanten keine Veränderung der Methyltransferaseaktivität und des Niveaus des erforderlichen Substrates S-Adenosylmethionin gefunden wurde (Kakutani *et al.* 1995). Im Gegensatz zu *MET1*-Mutanten zeigen Mutanten in *DDMI* nur geringe oder keine morphologischen Abnormalitäten (Vongs *et al.* 1993).

Mutanten in *KYP* und *AGO4* sind durch eine reduzierte DNA-Methylierung asymmetrischer Cytosine und von Cytosinen im Motiv CpNpG gekennzeichnet, wobei keine Veränderungen im Motiv CpG beobachtet werden. In *KYP*-Mutanten besteht diese Verringerung der Methylierung genomweit, während bei *Ago4*-Mutanten nur bestimmte Loci demethyliert sind. KRYPTONITE kodiert für ein SET-Domänen-Protein mit starker Homologie zur *SU(VAR)3-9*-Klasse von H3K9 (Histon H3 Lysin 9)-Methyltransferasen (Rea *et al.* 2000, Baumbusch *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002). In *KYP*-Mutanten unterbleibt infolge der fehlenden H3K9-Methylierung die spezifische Bindung von Chromomethylase 3 (*CMT3*) an das Chromatin, sodaß *KYP*-Mutanten bezüglich der veränderten DNA-Methylierung phänotypisch *CMT3*-Mutanten entsprechen (Jackson *et al.* 2002). Die Bindung von *CMT3* erfolgt dabei nicht direkt an Lysin 9-methyliertes Histon H3, sondern wird über *LHP1* (*Like* Heterochromatin Protein 1) (Gaudin *et al.* 2001), dem *Arabidopsis*-Homologen zum *Drosophila* *HP1* vermittelt, welches sowohl *CMT3* als auch spezifisch Lysin 9-methyliertes Histon H3 bindet (Jackson *et al.* 2002). Da Mutanten in *AGO4* sowohl reduzierte H3K9-Methylierung als auch locusspezifisch reduzierte DNA-Methylierung zeigen, wird *AGO4* eine dem beschriebenen Regulationsmechanismus übergeordnete Funktion zugeschrieben (Zilberman *et al.* 2003).

1.7 Gegenstand der Arbeit

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten bestand darin, Beiträge zur Aufklärung der komplexen Regulationsmechanismen der Chromatinstruktur und deren Bedeutung für differentielle Genaktivität als Grundlage der Zelldifferenzierung in Pflanzen zu leisten.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit in *Arabidopsis thaliana* ein sensitives *Silencing*-Testsystem auf der Basis transkriptionell inaktivierter transgener Reportergene (GUS, Luciferase) etabliert, das die Identifizierung von Proteinen mit Funktion beim Aufbau und der Regulation der Chromatinstruktur im Kern pflanzlicher Zellen erlaubt. Im Gegensatz zu den meisten der bereits existierenden *Silencing*-Systeme (Assaad *et al.* 1993, Mittelsten Scheid *et al.* 1998) basiert bei diesem neuen Testsystem die Selektion von Modifikatoren für TGS nicht auf der Reaktivierung einer Antibiotikaresistenz. Durch die Verwendung von Luciferase als transgener Reporter mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze und guter Quantifizierbarkeit eröffnete sich mit diesem Testsystems die Möglichkeit zur gezielten Suche nach Mutanten mit relativ schwacher oder organspezifischer Transgenreaktivierung, die unter Verwendung eines *Lethalscreen* mittels Antibiotika unerkant blieben. Entsprechend gelang die Isolierung und Charakterisierung von zahlreichen Mutanten, deren Defekte TGS beeinflussen und somit möglicherweise auf Veränderungen der Chromatinstruktur zurückzuführen sind. Von den etwa 100 selektierten putativen *Silencing*-Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit 19 Linien näher charakterisiert und die wahrscheinlichen Mutationsorte von 15 Linien kartiert. Bei zwei allelen Mutanten mit gewebespezifischer *Silencing*-Suppression konnten Punktmutationen im *TTG2*- (*transparent testa glabra 2*) Locus als Ursache für die beobachtete TGS-Suppression identifiziert werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das *TTG2*-Genprodukt in *Arabidopsis* gewebespezifisch an der Kontrolle von TGS in Zellen beteiligt ist, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickelt haben.

Die Eignung des im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten *Silencing*-Testsystems zur funktionellen Analyse pflanzlicher Chromatinproteine wird am Beispiel von Untersuchungen an *AtSUVH2*, einem pflanzlichen SET-Domänen-Protein (Baumbusch *et al.* 2001), gezeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), GibcoBRL (Eggenstein), Biorad (München), Amersham Pharmacia (Freiburg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt). Die verwendeten Radiochemikalien α -[³²P]-dATP und α -[³²P]-UTP wurden von ICN Pharmaceuticals (Irvine, USA) geliefert.

Restriktionsenzyme, Ribonuklease A, DNA-Polymerasen und T4-DNA-Ligase wurden von Boehringer (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Appligene (Heidelberg), Promega (Madison, USA) oder Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

2.1.2 Pflanzenmaterial

Als pflanzlicher Modellorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* verwendet. Aus der großen Kollektion bekannter Ökotypen dieser Art wurden für die Untersuchungen die zur Zeit am besten charakterisierten Ökotypen *Columbia* und *Landsberg* ausgewählt. Durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt und andere Sequenzierprojekte ist nahezu die gesamte DNA-Sequenz des Erbguts dieser beiden Ökotypen bekannt (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000). Für die Sequenzpolymorphismen zwischen den Genomen der beiden verwendeten Ökotypen existiert eine für nichtkommerzielle Anwender kostenfrei zugängliche Datenbank der Firma Cereon[®] Genomics (Cambridge).

Weiterhin wurde für Komplementationsanalysen die im Ökotyp *Landsberg* durch Transposonmutagenese erzeugte Mutante *ttg2-1* (*transparent testa glabra 2*) (Johnson *et al.* 2002) verwendet, die freundlicherweise von David Smyth (*Monash University*, Victoria, Australien) zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.3 Medien für die Kultur der Pflanzen

Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* erfolgte überwiegend auf einem Gemisch von gleichen Teilen Sand und Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa). Die Anzucht axenischer Ganzpflanzen von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf einem modifizierten Medium nach Murashige und Skoog (1962), bezogen von Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Zur Herstellung festen Mediums für Selektionsplatten wurden 8 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

2.1.4 Mikroorganismen

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH 5 α wurde als Wirt für die zu klonierende DNA eingesetzt. Die relevanten genetischen Marker dieses Stammes sind: F-O- endA1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF) deoR U169 (ϕ 80d lacZ Δ M15) (Woodcock *et al.* 1989).

Zur Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Systems und One Shot[™] - TOP10-Zellen wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10 verwendet. Die relevanten genetischen Marker dieses Stammes sind: F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 D(lacX74) deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen; Groningen, Niederlande).

Zur Übertragung von DNA auf Pflanzenzellen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 verwendet (Koncz und Schell 1986).

2.1.5 Bakterielle Nährmedien

Die Vermehrung der Bakterienstämme von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* bzw. die Selektion der erhaltenen Klone erfolgte auf LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl). Zur Herstellung festen Mediums für Selektionsplatten wurden 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Für die Plasmidselektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) verwendet. Bestand bei einer Klonierung die Möglichkeit der Nutzung des lacZ α -Systems zur Selektion von Rekombinaten, wurden die Selektionsplatten mit je 40 μ l X-Gal- (20 mg/ml) und IPTG-Lösung (100 mM) bestrichen. Für die Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 pMP90 wurden dem Medium die Antibiotika Gentamycin (10 mg/l) und Rifampicin (100 mg/l) zugesetzt. Die Bestandteile des Kulturmediums wurden von der Firma DifcoLab (Detroit, USA) bezogen. Für die Selektion wurden die Antibiotika der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande) verwendet.

2.1.6 Vektoren

In Tabelle 1 sind die während der Arbeit verwendeten Plasmide mit Angabe ihrer wichtigsten Merkmale, der Verwendung und der Herkunft aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Vektoren.

Vektor	Merkmale	Verwendung / Referenz
pBluescript [®] II KS (+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor / Stratagene (Heidelberg)
pGEM [®] -3Zf(+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor / Promega (Madison, USA)
pCR [®] 2.1(-TOPO)	Amp ^r , Kan ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor für PCR-Produkte/ Invitrogen (Groningen, Niederlande)
PSR- <i>luc</i> +	Amp ^r , MCS, <i>LUC</i> +	Herkunft des optimierten Luciferasegens / Promega (Madison, USA)
pRT100	Amp ^r , MCS, CaMV-35S-Promotor, CaMV-35S-Poly-A-Signal	Herstellung von Expressionskassetten für die Pflanzentransformation / Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pRT101	Amp ^r , MCS, CaMV-35S-Promotor, CaMV-35S-Poly-A-Signal	Herstellung von Expressionskassetten für die Pflanzentransformation / Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pBIN m-gfp5-ER	Kan ^r , CaMV-35S-Promotor T-DNA- <i>borders</i> , <i>NPT II</i> , <i>m-gfp5-ER</i> , Poly-A-Signal	Herkunft des GFP-Reportergens / Haseloff <i>et al.</i> (1997)
pGPTV-KAN	Kan ^r , T-DNA- <i>borders</i> , <i>NPT II</i> , GUS	Binärer Vektor zur Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Becker <i>et al.</i> (1992)
pCB302	Kan ^r , MCS, T-DNA- <i>borders</i> , <i>BAR</i>	Binärer Vektor zur Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Xiang <i>et al.</i> (1999)
BAC-Klon F3G5 (AC005896.2)	pBeloBAC, Kan ^r , MCS	enthält ca. 120 kb genomische Sequenz von <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i> / ABRC-DNA Stock Center (Columbus, USA)

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA

Mit der Methode nach Brandstädter *et al.* (1994) wurde Gesamt-DNA aus Blattmaterial in einer für die angewandten Verfahren und enzymatischen Reaktionen hinreichenden Qualität isoliert. Zur Präparation wurden 3 - 5 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines vorgekühlten Glasstabes fein zermörsert und in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) aufgenommen. Nach gründlichem Suspendieren des Materials wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l essigsaurer Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und für mindestens 10 min im Eisbad inkubiert. Zur Sedimentation der Zelltrümmer wurde 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) extrahiert. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation für 6 min bei 6000 x g wurde die DNA aus der wässrigen Oberphase mit 500 μ l Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 μ g/ml RNase A aufgenommen.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die auch unter der Bezeichnung *Boiling Lysis* bekannte Methode (Holmes und Quigley 1981) wurde zur Präparation von Plasmiden aus Bakteriensuspensionskulturen genutzt. Die erzielte Reinheit der isolierten Plasmid-DNA war für alle Anwendungen ausreichend. Zur Präparation wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur sedimentiert und das Pellet in 500 μ l eiskalter STET-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 8 % (w/v) Saccharose; 5 % Triton X 100) und 20 μ l Lysozym-Lösung (20 mg/ml) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einem Heizblock für 2 min bei 100°C aufgeköcht und erneut 5 min auf Eis stehen gelassen. Durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g wurden die Zelltrümmer abgetrennt und die Plasmid-DNA in einem neuen Reaktionsgefäß aus dem Überstand mit 500 μ l Isopropanol gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 20000 x g wurde das Pellet mit

70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.3 Isolation von RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial für *Northern*-Analysen und RT-PCR-Experimente wurde die Trizol[®]-Methode entsprechend den Angaben des Herstellers (GibcoBRL) angewandt. Dazu wurden jeweils 3 - 5 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines Glasstabes möglichst fein zerstoßen und in 1 ml Trizol suspendiert (Vortex). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 240 µl Chloroform zugegeben, gemischt und wieder 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (10 min, 6000 x g). Aus der Oberphase wurde die RNA mit 1 Volumen Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (10 min, 20000 x g). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.4 Erzeugung, Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden entweder durch PCR oder durch Restriktion von Plasmiden gewonnen. Die sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter Beachtung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Je µg DNA wurden 1 bis 5 U Enzym eingesetzt und für 1 bis 12 h inkubiert. Die Reinigung und Isolation restringierter DNA von Restriktionsenzymen und ungeschnittenen Vektormolekülen erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Elution der Fragmente mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Anschließend wurden die Restriktionsfragmente mittels Ligase in entsprechend linearisierte Vektoren kloniert. Für den Ligationsansatz wurde das Fragment mit Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 5:1 bis 10:1 gemischt. Die Ligation erfolgte mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 14°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Zu klonierende PCR-Produkte wurden zur Verringerung von PCR-Fehlern mit *Pfu*-Polymerase (*proof reading*-Funktion) amplifiziert. Im Anschluß wurde diesen PCR-

Produkten bei 72°C mit *Taq*-DNA-Polymerase ein 3'-überhängendes Adenosin-Nukleotid angehängt. Die Fragmente wurden dann über die Topoisomerasefunktion des pCR[®]2.1-TOPO-Vektors entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen) in diesen Vektor ligiert.

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte nach der Methode des *Cycle Sequencing* mit fluoreszenzmarkierten Primern (IRD 700 bzw. 800, MWG-Biotech) auf einem LICOR 4000L oder LICOR 4200 (MWG-Biotech). Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der DNA*STAR-Software (Lasergene; Madison, USA) analysiert.

2.2.5 RT-PCR-Analysen

Die semiquantitativen RT-PCR-Experimente wurden mit dem *Ready-to-go RT-PCR-Kit* von Amersham Pharmacia (Freiburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Zur quantitativen Kontrolle wurde der RT-PCR-Ansatz vor Zugabe des Primers für die Erststrangsynthese geteilt und parallel ein ca. 600 bp-Fragment des *Arabidopsis*-Elongationsfaktors 1α in 20 Zyklen amplifiziert. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM verwendet und die PCR-Bedingungen den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepaßt.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8; 2 mM EDTA) oder TBE-Puffer (100 mM Tris-Borat pH 8,3; 1 mM EDTA) bei Spannungen von 1 bis 6 V/cm und Agarosekonzentrationen zwischen 0,3 und 3 %. Die Agarosegele enthielten zum Anfärben der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Den Proben wurde zum Auftragen auf das Gel 0,2 Volumen Stoppuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 120 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt. Als Größenmarker wurde bei der Elektrophorese eine 1 kb DNA-Leiter der Firma GibcoBRL aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen horizontalen Agarosegelen in MOPS-Puffer (40 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA) bei einer Spannung von 3 V/cm. Die Agarosegele enthielten 50 %

Formamid und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Anfärben der RNA. Den Proben wurde zum Auftragen auf das Gel 0,1 Volumen Ladepuffer (40 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) zugesetzt.

Zur Dokumentation von im Agarosegel aufgetrennter RNA bzw. DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem Cybertech CS1 (Cybertech, Berlin) in Verbindung mit einem Transilluminator verwendet.

2.2.7 *Nuclear Run-On* Transkription

Die Methode wurde nach Dehio und Schell (1994) durchgeführt. Zur Präparation der Zellkerne wurden 5 g der in Flüssigkultur angezogenen Pflanzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerstoßen. Alle weiteren Schritte der Kernpräparation wurden im Eisbad bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Material wurde in 40 ml Puffer A [250 mM Saccharose; 10 mM NaCl; 10 mM MES pH 6,6; 5 mM EDTA; 0,15 mM Spermin-HCl, 0,5 mM Spermidinphosphat; 0,2 mM Pefabloc[®] (Promega); 20 mM Merkптоethanol] mit 0,6 % Triton X-100 und 2 % Dextran T40 suspendiert und mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Nach Filtration durch ein 50 µm-Nylonsieb wurde 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml desselben Puffers resuspendiert, auf einen Stufengradienten (jeweils 3,5 ml 2 M Saccharose, 80 % Percoll, 60 % Percoll und 40 % Percoll in Puffer A) geladen und 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Zellkerne wurden aus der Interphase zwischen Saccharose und 80 % Percoll abgenommen und mit 10 Volumen Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 10 mM Merkптоethanol; 20 % Glycerin) gewaschen und danach 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Nach der Wiederholung des Waschschrittes wurde das Pellet erneut in Puffer B resuspendiert. Ein Aliquot der Suspension wurde mit DAPI angefärbt und mit Hilfe einer Zählkammer unter einem Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Anschließend wurde die Kernsuspension mit Puffer B auf eine Dichte von 10⁴ Zellkerne pro µl eingestellt und als 300 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Zur *in-vitro*-Transkription wurde mit einem 300 µl Aliquot der Zellkernsuspension in einem Endvolumen von 400 µl eine Endkonzentration von 40 mM Mg(NH₄)₂SO₄; 0,5 mM MnCl₂; je 0,5 mM ATP, CTP, GTP und α-[³²P]-UTP eingestellt und 30 min bei 29°C inkubiert. Durch Zugabe von 32 µl Hefe-rRNA (5 mg/ml), 40 µl Puffer C (200 mM HEPES pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂) und 150 Units RNase-freie DNase I wurde die Reaktion beendet. Nach

einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 50 µl Puffer D (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA, 10 % SDS) und 4 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) extrahiert und aus dem Überstand die nicht eingebauten Nukleotide mit *ProbeQuant*[®] *G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Jeder der erzeugten Ansätze wurde zum Hybridisieren identischer Filter mit jeweils 200 ng *LUC*-, *NPT II*-, *EF1 α*- und 25S-(Kartoffel)-rRNA-Fragment eingesetzt.

2.2.8 Hybridisierungsexperimente

Für DNA-Hybridisierungsexperimente (*Southern*) wurden die Agarosegele nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA für 30 min in Denaturierungslösung (1 M NaOH; 1,5 M NaCl) inkubiert und anschließend zweimal 30 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl) gewaschen. Die so vorbereitete DNA wurde durch Kapillarblottechnik mit 20xSSC (0,3 M Natriumcitrat-Puffer pH 7,4; 3 M NaCl) aus dem Gel auf ungeladene Nylon-Membranen (Amersham Pharmacia) transferiert und im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, USA) durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gekoppelt.

Die als Sonden zur Hybridisierung verwendeten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *Megaprime DNA-labelling Kits* (Amersham Pharmacia) mit 50 µCi α-[³²P]-dATP nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuant*[®] *G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Menge der in die DNA-Fragmente eingebauten Radioaktivität wurde in dem Mikroquantifizierer QC4000 XER (Bioscan) quantifiziert. Die Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des ExpressHyb[®]-Puffers (Clontech) nach dem Protokoll des Herstellers. RNA-Hybridisierungsexperimente (*Northern*) wurden unter Auslassung der Denaturierungs- und Neutralisierungsschritte in gleicher Weise durchgeführt. Die Analyse der Autoradiographien erfolgte mit Hilfe des PhosphoImagers Storm II der Firma Molecular Dynamics (Krefeld).

2.2.9 Transformation von *Escherichia coli*

Die auf Mandel und Higa (1970) zurückgehende Methode zur Übertragung isolierter DNA auf CaCl₂-behandelte Zellen führte zu ausreichenden Transformationsraten. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine 50 ml LB-Flüssigkultur mit 1 ml einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* DH5 α beimpft und bis zu einer OD₅₅₀=0,3 kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 5 min bei 3000 x g sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 25 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2,5 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und sofort transformiert oder nach Zugabe von 15 % Glycerin bei -70°C als 200 μ l-Aliquotes aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 200 μ l Aliquot kompetenter Zellen im Eisbad aufgetaut und maximal 20 μ l einer Lösung des zu transformierenden Plasmids zugegeben. Nach Inkubation für 1 h im Eisbad erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C und 160 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf transformierte Zellen wurden 100 μ l des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und für ca. 24 h bei 37°C bebrütet.

2.2.10 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Mit der auf Höfgen und Willmitzer (1988) zurückgehende Methode zur Übertragung isolierter DNA auf Agrobakterien wurden ausreichende Transformationsraten erzielt. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 - 4 ml einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 10 mg/l Gentamycin und 100 mg/l Rifampicin gegeben und für 6 - 10 h im Schüttelinkubator bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 10 min bei 3000 x g sedimentiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert, zu jeweils 200 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 200 μ l Aliquot kompetenter Zellen im Eisbad aufgetaut, 1 - 5 μ g Plasmid-DNA zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in flüssigem Stickstoff für 5 min eingefroren. Als Hitzeschock wurden die Zellen für 5 min in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 2 - 4 h bei 28°C und 160 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf

transformierte Zellen wurden 100 µl des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und ca. 48 h bei 28°C bebrütet.

2.2.11 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde erfolgte in einer Phytokammer der Firma Heraeus (Hanau) bzw. in Klimaschränken von Percival Scientific Inc. (Perry, USA) unter Kurztagbedingungen mit 8 Stunden Licht bei 23°C und 16 Stunden Dunkelheit bei 20°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen in Kulturschränke mit Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) oder in Gewächshauskammern mit Tageslicht und Zusatzbeleuchtung umgeräumt.

Die axenischen Ganzpflanzenkulturen von *Arabidopsis thaliana* wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf MS-Medium erzeugt. Zum Sterilisieren wurden die Samen ca. 20 Minuten mit Natriumhypochlorid-Lösung (6 % freies Chlor) inkubiert und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Kultur erfolgte in Petrischalen auf MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar bei 26 - 28°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h : 8 h.

Die Anzucht der Pflanzen für die Untersuchung zum Einfluß der Hemmstoffe 5-Azacytidin und Trichostatin A erfolgte unter sterilen Bedingungen in 24-Loch-Platten mit je 1 ml MS-Flüssigmedium, dem unterschiedliche Mengen Hemmstoff zugesetzt wurden.

2.2.12 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Knospen der als weiblicher Kreuzungspartner vorgesehenen Pflanze mit Hilfe einer Pinzette alle Blütenorgane mit Ausnahme des Stempels entfernt. Im Anschluß wurde eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners mit der Pinzette so am Blütengrund gefaßt, daß sich die Blüte beim Zusammendrücken der Pinzette weit öffnet. Dadurch stehen die Staubgefäße frei nach außen, so daß damit der Stempel des weiblichen Kreuzungspartners bestäubt werden kann. Die Bestäubung der präparierten Stempel wurde zweimal im Abstand von ca. 24 h wiederholt.

2.2.13 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der Vacuuminfiltrationsmethode (Bechtold *et al.* 1993) bzw. der Blütentauchmethode (*floral dip*) (Clough und Bent 1998). Für beide Methoden wurden zunächst 500 ml LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Rifampicin und 10 mg/l Gentamycin mit einer 50 ml Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht bei 28°C kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (20 min, 4000 x g).

Für die Vakuuminfiltrationsmethode wurde das Bakterienpellet in 200 ml Infiltrationsmedium (0,5 x MS-Medium, 3 % Saccharose, 0,044 µM BAP) aufgenommen. Die Blütenstände von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen wurden in diese Suspension getaucht und einem Vakuum ausgesetzt, bis an Stamm und Blüten starke Bläschenbildung zu beobachten war. Nach der Infiltration wurden die Blütenstände mit Wasser gewaschen und vorsichtig abgetupft.

Für die Blütentauchmethode wurde das Bakterienpellet in 100 ml einer 5 %igen Saccharose-Lösung mit 0,05 % Silwet L-77 aufgenommen. In diese Suspension wurden die Blütenstände und Blattrosetten von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen für einige Sekunden getaucht.

Die infiltrierten bzw. getauchten Pflanzen wurden für 24 Stunden dunkel gestellt und dann bis zum Reifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Selektionsmarker wurden zwei verschiedene Methoden für die Selektion transgener Pflanzen angewandt. Transgene Pflanzen mit Kanamycin- bzw. Hygromycinresistenz als Selektionsmarker wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf zuckerfreiem MS-Medium mit 50 mg/l des entsprechenden Antibiotikums von nicht transgenen Pflanzen getrennt. Die Kultur erfolgte bei 26 - 28°C unter Langtagbedingungen. Nach 10 - 14 Tagen wurden die überlebenden Pflanzen auf Erde umgesetzt.

Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem *BAR*-Gen als Resistenzmarker wurden die Pflanzen auf Erde kultiviert und im Keimblattstadium mit einer 1:5000-Verdünnung des Herbizids Basta® (Hoechst Schering AgrEvo GmbH) besprüht. Falls erforderlich wurde die Behandlung im Abstand von 3 - 5 Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war. Die Kultur erfolgte bei 23°C unter Kurztagbedingungen.

2.2.14 Mutagenese von *Arabidopsis thaliana*

Die Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* mit EMS erfolgte nach Leyser und Furner (1992). Zunächst wurden die zu mutagenisierenden Samen über Nacht in 13,4 mM KCl-Lösung vorgequollen. Im Anschluß wurden die Samen 4 Stunden in einer Lösung von 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 5,0 mit 5 % DMSO und 90 mM EMS inkubiert. Durch zweimaliges Waschen für 15 Minuten mit 100 mM Natriumthiosulfatlösung wurde das EMS zerstört. Danach wurde zweimal 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Die mutagenisierten Samen wurden anschließend mit Hilfe einer Pipette und etwas Wasser gleichmäßig auf Erde ausgesät.

2.2.15 Kartierung der Mutationsorte

Die Kartierung der Mutationsorte erfolgte durch die Analyse der Segregation von bekannten Sequenzpolymorphismen (mittels CAPS-Markern für *cleaved amplified polymorphic sequence*) oder Sequenzlängenpolymorphismen (mittels SSLP-Markern für *simple sequence length polymorphism*) zwischen 2 verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*. Dazu wurden aus der F₂-Generation von Kreuzungen zwischen dem *Arabidopsis*-Ökotyp *Landsberg* und der jeweiligen Mutante mit dem genetischen Hintergrund des *Arabidopsis*-Ökotyps *Columbia* wieder homozygote Mutanten selektiert. In dieser Kartierungspopulation wurden die zu untersuchenden Sequenzbereiche mit Hilfe der PCR unter Verwendung von spezifischen Primerpaaren (s. Anhang) amplifiziert und bei SSLP-Markern direkt bzw. bei CAPS-Markern nach einem Restriktionsschritt hinsichtlich der Polymorphismen analysiert. Dazu wurden die PCR- bzw. Restriktionsprodukte in 3 %igen Gelen aus gleichen Teilen Agarose und *Low Melting*-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TBE-Puffer (s. Kap. 2.2.6) entsprechend ihrer Größe getrennt. Ist keine Kopplung zwischen dem untersuchten Marker und dem Mutationsort vorhanden, sind die Sequenzbereiche der beiden Ökotypen i.a. statistisch gleich verteilt. Tritt bei der Analyse der Polymorphismen in der Kartierungspopulation eine eindeutige Anreicherung des *Columbia*-Sequenzbereichs auf, so ist dieser Marker mit der Mutation gekoppelt. Je stärker die Kopplung, desto näher ist der Mutationsort bei dem untersuchten Marker.

2.2.16 Nachweis von Luciferase, β -Glucuronidase und GFP

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in transgenen Pflanzen erfolgte ausschließlich *in vivo* mit einem Kamerasystem der Firma Hamamatsu Photonic Deutschland GmbH (Herrsching) unter Verwendung der Argus 50-Software des Kameraherstellers. Das für die Enzymreaktion erforderliche Substrat Luciferin wurde als Natriumsalz eingesetzt und von der Firma Molecular Probes (Oregon, USA) bezogen. Die Pflanzen wurden mindestens 10 Minuten vor Beginn der Messung mit Luciferinlösung (1,3 mM) besprüht. Axenische Flüssigkulturen wurden so mit Luciferin versetzt, daß eine Endkonzentration von 50 μ M vorlag. Bei der Messung wurden die emittierten Photonen mit einer CCD-Kamera erfasst und die Photonendichte in Form eines Falschfarbendes dargestellt, wobei weiß hohe und dunkelblau niedrige Photonendichte symbolisiert. Die Sensitivität der Kamera wurde auf einer Skala von 0 bis 10 bei allen Messungen auf den Wert 7 eingestellt. Für die Aufspreizung der Farbskala (*BitRange*) wurde für alle Darstellungen die empfindlichste Einstellung (0-3) gewählt.

Zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität (GUS) wurden von den zu untersuchenden Pflanzen jeweils 2 Blätter abgeschnitten und für ca. 24 h bei 37°C in 2 ml Reaktionspuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton, 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin, 0,1 % β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml X-Gluc) inkubiert. Anschließend wurden die Blätter zum Entfärben dreimal für jeweils ca. 24 h bei 4°C mit 70 %igem Ethanol gewaschen.

Der Nachweis des für die Expression in *Arabidopsis* genetisch optimierten GFP (grün fluoreszierendes Protein) (m-gfp5-ER) wurde entsprechend den Angaben der Hersteller (Haseloff *et al.* 1997) durchgeführt. Das verwendete GFP hat zwei Anregungsmaxima bei 395 nm und 473 nm und ein Fluoreszenzmaxima bei 510 nm. Zur Nutzung des Anregungsmaxima von 473 nm (z. B. Argon-Laser) stand kein geeignetes Gerät zur Verfügung. Für die Anregung des zweiten Maxima bei 395 nm wird vom Hersteller die Verwendung einer UV-Handlampe als geeignetes Gerät empfohlen. Entsprechend erfolgten die Untersuchungen zur GFP-Expression in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer UV-Handlampe bzw. unter Verwendung des Gerätes Fluotest[®] (Heraeus, Hanau), einer Kammer zur Betrachtung von Dünnschichtchromatogrammen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines transgenen Testsystems für TGS

3.1.1 Herstellung der T-DNA-Konstrukte zur Induktion von TGS

Zur transgenen Expression der verwendeten Reportergene GUS, Luciferase und *GFP* in *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Columbia*) wurde jeweils eine Expressionskassette hergestellt, die aus dem CaMV-35S-Promotor, einem Reporter-gen und dem CaMV-35S-Poly-A-Signal besteht. Zur Erzeugung homologieabhängiger Transgeninaktivierung wurden 1 bis 4 Kopien einer Expressionskassette derart auf der T-DNA des binären Transformationsvektors pGPTV-KAN angeordnet, daß sowohl direkte als auch invertierte Sequenzwiederholungen entstanden. Die Struktur der mit den einzelnen Reportergenen hergestellten T-DNA-Konstrukte ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Da die Klonierung direkt invertierter Sequenzmotive nicht gelang, wurde bei der Konstruktion von Sequenzinversionen der Selektionsmarker *NPT II* (Kanamycinresistenz) zwischen die invers orientierten homologen Expressionskassetten eingefügt. Eine Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung der Expressionskassetten und der in Abbildung 1 gezeigten T-DNA-Konstrukte befindet sich im Anhang. Die T-DNA-Konstrukte mit dem GUS-Reporter-gen wurden von Dr. Bettina Tschiersch hergestellt.

3.1.2 Transformation und Selektion transgener Pflanzen

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* führte sowohl mit der Vakuuminfiltrationsmethode als auch mit der Blütentauchmethode (*floral dip*) zu Transformationsraten zwischen 0,1 und 1 Prozent. Für jedes der beschriebenen T-DNA-Konstrukte wurde eine umfangreiche Zahl transgener Pflanzen selektiert (Tab. 2).

Tab. 2: Anzahl der für die verschiedenen Konstrukte selektierten primärtransgenen Pflanzen.

Konstrukt	LUC 1	LUC 2	LUC 3	LUC 4	LUC 5	GUS 1	GUS 2	GUS 3	GFP 1	GFP 2	GFP 3	GFP 4
Anzahl transgener Pflanzen	30	26	17	16	9	23	30	53	24	16	37	5

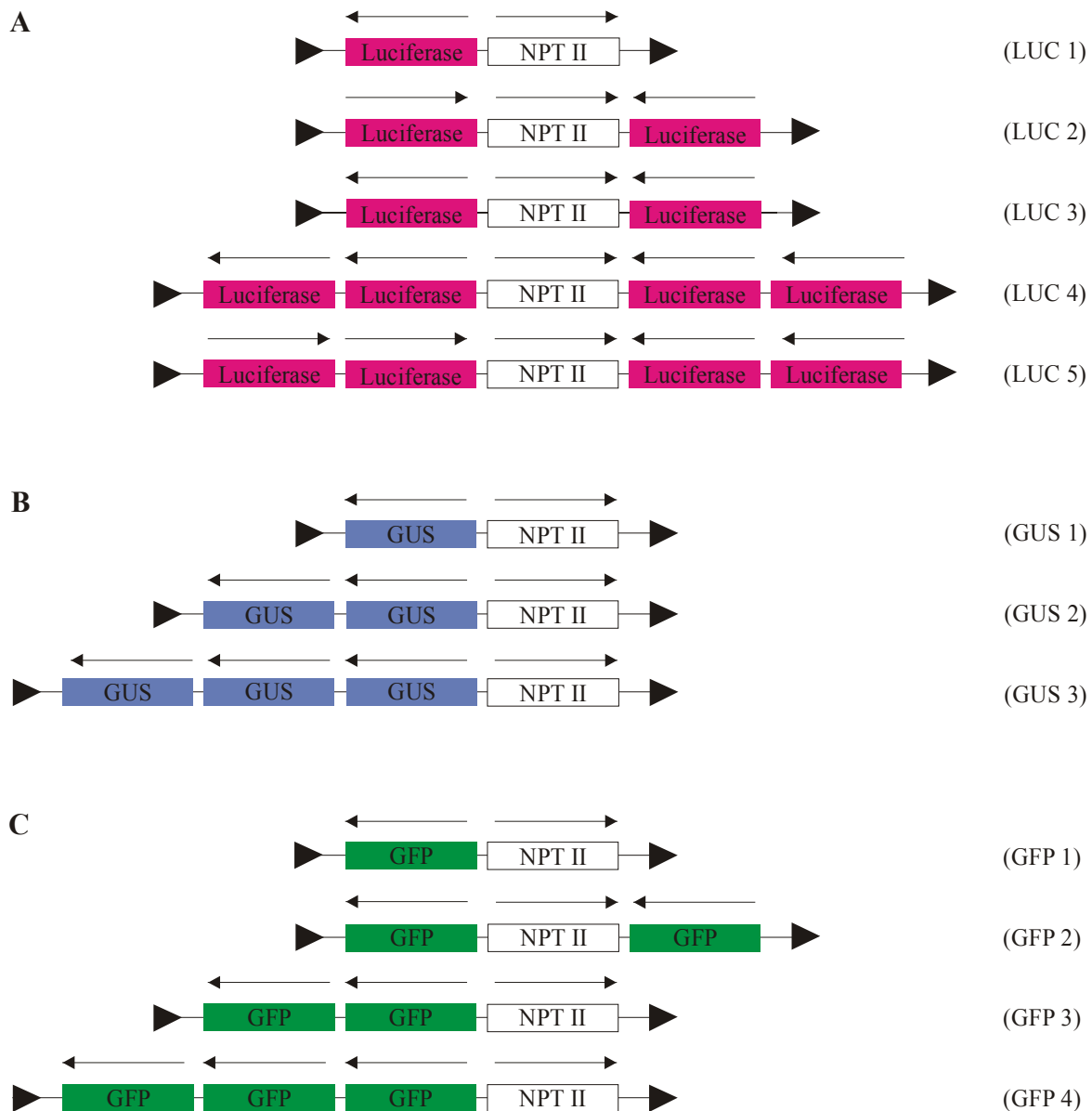


Abb. 1: Struktur der hergestellten T-DNA-Konstrukte. Dargestellt sind die mit Luciferase (A), GUS (B) und GFP (C) hergestellten T-DNA-Konstrukte. Die Reportergene befinden sich jeweils unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors. Der Selektionsmarker *NPT II* wird durch den *NOS*-Promotor reguliert. Die Pfeile bezeichnen die jeweilige Transkriptionsrichtung innerhalb der Expressionskassette.

3.1.3 Untersuchung zur Expression der transgenen Reporter

3.1.3.1 Transgenexpression der Luciferaselinien

Bei allen selektierten Primärtransformanden (T1) mit dem Luciferase-Transgen auf der T-DNA konnte Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Allerdings traten bereits bei den Primärtransformanden deutliche Unterschiede zwischen Pflanzen mit verschiedenen T-DNA-Konstrukten auf. Pflanzen, die nur eine Luciferase-Expressionskassette pro Insertion tragen (Konstrukt LUC 1), zeigten in der Regel erheblich mehr

Transgenaktivität als Pflanzen mit mehreren Expressionskassetten auf der T-DNA (Abb. 2). Zwischen den primärtransgenen Pflanzen mit dem Konstrukt LUC 2 (*inverted repeat*) und dem Konstrukt LUC 3 (*direct repeat*) konnte kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Transgeninaktivierung festgestellt werden. Wobei zwischen den einzelnen, mit diesen Konstrukten erhaltenen Pflanzen starke Schwankungen der Transgenexpression auftraten (Abb. 2 B). Das Spektrum reichte hier von nicht bis nahezu vollständig inaktiviert. Im Gegensatz dazu zeigten fast alle Pflanzen mit vier Expressionskassetten pro Insertion (Konstrukte LUC 4 und LUC 5) beträchtlich reduzierte Transgenaktivität (Abb. 2 C). Insbesondere bei Pflanzen mit dem Konstrukt LUC 4 (*direct repeats*) wurde auffällig wenig Luciferaseaktivität nachgewiesen. Während der Kultur der Pflanzen über 4 Generationen konnte bei nahezu allen untersuchten Linien mit mehreren Luciferase-Expressionskassetten auf der T-DNA eine weiter fortschreitende Transgeninaktivierung beobachtet werden. Dies führte dazu, daß insbesondere bei einigen Linien mit Konstrukt LUC 4 bereits in der T3 keine Luciferaseaktivität mehr nachweisbar war.

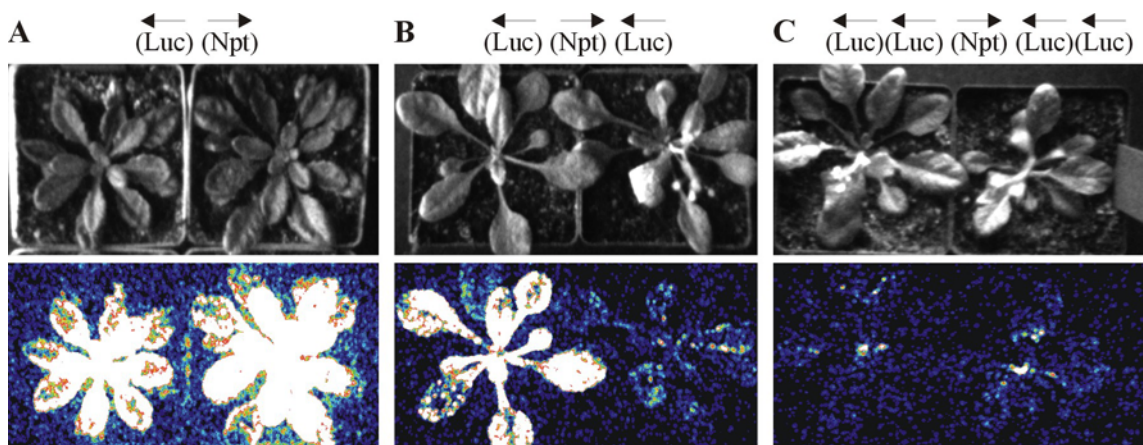


Abb. 2: Unterschiede in der Luciferaseaktivität bei primärtransgenen Pflanzen. Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität. Die einzelnen Pflanzen tragen T-DNA-Konstrukte mit einer (LUC 1) (A), zwei (LUC 3) (B) und vier (LUC 4) (C) Luciferase-Expressionskassetten. Die Luciferaseaktivität der dargestellten Pflanzen mit einer und vier Expressionskassetten auf der T-DNA ist repräsentativ für die meisten der mit diesen Konstrukten selektierten Primärtransgenen. Bei Pflanzen mit zwei Expressionskassetten pro T-DNA-Insertion treten starke Unterschiede hinsichtlich der nachweisbaren Luciferaseaktivität auf.

3.1.3.2 Transgenexpression der GUS-Linien

Sämtliche GUS-transgenen Linien wurden von Dr. Bettina Tschiersch erzeugt und charakterisiert. Bei allen selektierten Primärtransformanten (T1) mit dem GUS-Transgen auf der T-DNA konnte die entsprechende Enzymaktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit Luciferase als Reporter traten bei den

Primärtransformanden keine deutlichen Unterschiede zwischen Pflanzen mit verschiedenen T-DNA-Konstrukten auf. Erst im Ergebnis der Analyse der Transgenaktivität in den darauffolgenden drei Generationen (T2, T3 und T4) wurde bei einigen Linien mit dem Konstrukt GUS 3 eine fortschreitende Transgeninaktivierung beobachtet.

3.1.3.3 Transgenexpression der *GFP*-Linien

Der Nachweis des genetisch optimierten *GFP*-Reportergens bereitete mit den verwendeten UV-Lampen bereits bei Pflanzen Probleme, die mit dem von Haseloff *et al.* (1997) erhaltenen Vektor pBIN m-gfp5-ER transformiert wurden. Entsprechend konnte auch bei den selektierten Primärtransformanden mit dem *GFP*-Gen als Reportergen auf der T-DNA durch einfache Anregung mit den verwendeten UV-Lampen nicht in allen Fällen die Expression von *GFP* nachgewiesen werden. Bereits bei den Primärtransformanden mit nur einem *GFP*-Gen auf der T-DNA wurden starke Unterschiede in der Expression des Proteins zwischen einzelnen Pflanzen beobachtet. Da keine geeigneten Filter zur Abschirmung der bei UV-Bestrahlung grüner Pflanzen auftretenden roten Fluoreszenz des Chlorophylls zur Verfügung standen, konnte in einigen Fällen neben der starken Chlorophyllfluoreszenz keine *GFP*-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Bei Pflanzen mit mehreren *GFP*-Expressionskassetten auf der T-DNA konnte nur bei wenigen der erzeugten Primärtransformanden die Expression von *GFP* eindeutig nachgewiesen werden.

3.1.3.4 Auswahl geeigneter Linien für die Etablierung eines Testsystems

Auf der Basis von Segregationsanalysen und vor allem der Beobachtung der Transgenaktivität über 4 Generationen wurden 5 Luciferaselinien (bezeichnet als Startlinien 6, 7, 8, 9 und 12) für ein *Silencing*-Testsystem ausgewählt, die sich durch eine besonders starke und stabile Transgeninaktivierung auszeichnen. Alle ausgewählten Linien tragen das T-DNA-Konstrukt mit 4 Expressionskassetten in gleicher Orientierung (LUC 4). Mit Ausnahme der Startlinie 8, bei der keine Luciferaseaktivität nachweisbar ist, zeigen viele Pflanzen der anderen Ausgangslinien sehr geringe Luciferaseexpression in den Keimblättern (Abb. 3 A) sowie mit dem Alter der Pflanzen zunehmende Luciferaseaktivität in alten und absterbenden Blättern (Abb. 3 B).

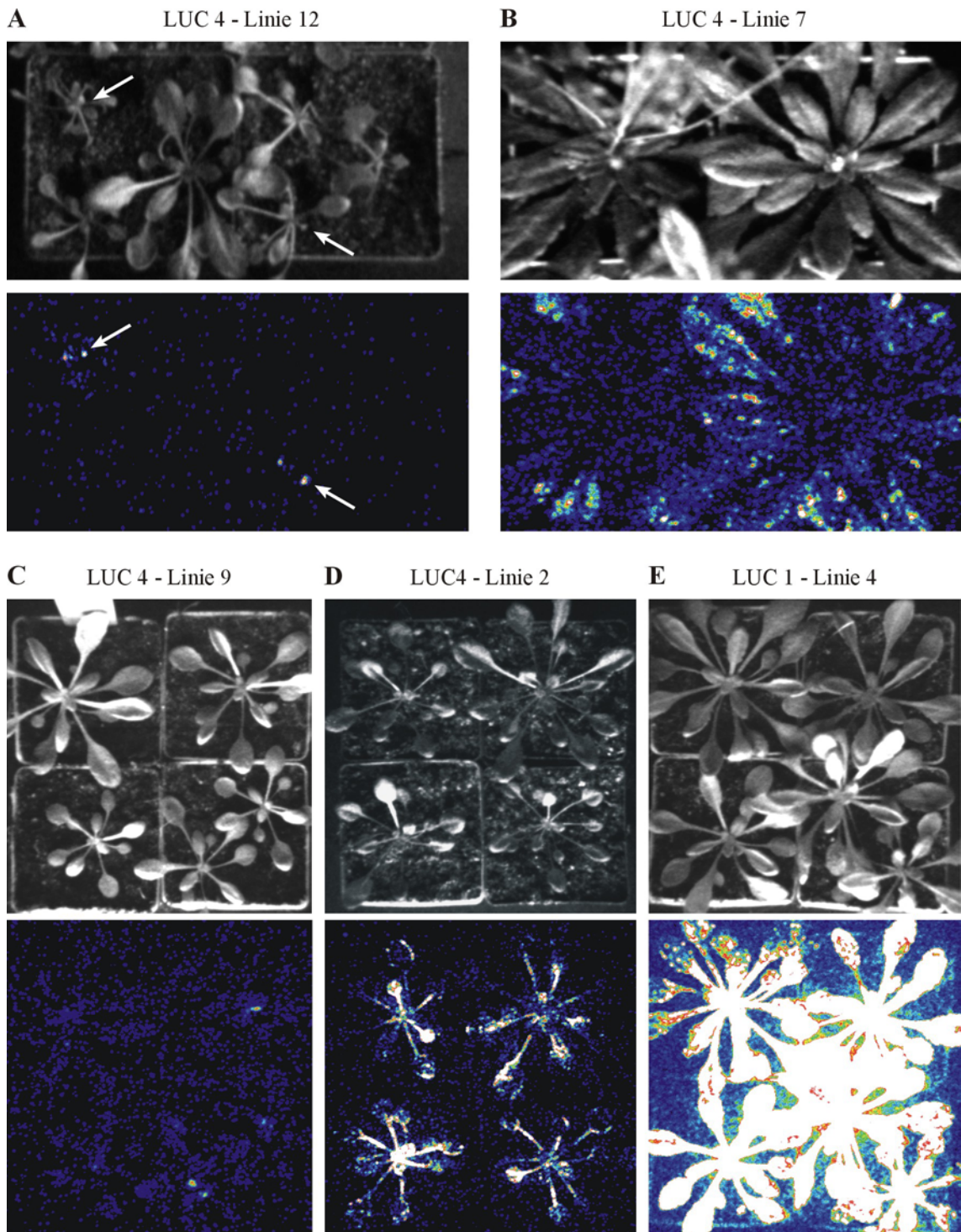


Abb. 3: Luciferaseexpression in den ausgewählten Linien mit dem Konstrukt LUC 4.

Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität. Die Abbildung zeigt Pflanzen der T4-Generation. Außer in einigen Keimblättern junger Pflanzen (Pfeile) (A) und absterbenden Blättern alter Pflanzen (B) ist in den stark inaktivierten Linien meist keine Luciferaseaktivität nachweisbar (C). Pflanzen der partiell inaktivierten LUC4-Linie 2 (D) zeigen im Vergleich zu Pflanzen mit dem Konstrukt LUC 1 (E) nur noch geringe Luciferaseaktivität homogen bei allen Nachkommen.

Außerdem wurde eine weitere Linie (Startlinie 2) mit diesem T-DNA-Konstrukt etabliert, die z.B. im Vergleich mit der stark inaktivierten Linie 9 (Abb. 3 C) nur eine partielle Transgeninaktivierung aufweist (Abb. 3 D). Diese Linie zeigt homogen bei

allen Nachkommen deutlich weniger Luciferaseaktivität als z.B. Pflanzen der nicht inaktivierten Linie 4, die das Konstrukt LUC 1 tragen (Abb. 3 E).

Von den GUS-transgenen Linien wurde im Ergebnis der Beobachtung der Transgenaktivität über 4 Generationen eine Linie (Startlinie 13) mit 3 Expressionskassetten auf der T-DNA (Konstrukt GUS 3) zur Verwendung für das *Silencing*-Testsystem ausgewählt, die bei allen Nachkommen nahezu vollständige Transgeninaktivierung zeigt. Außerdem wurde eine weitere GUS-Linie etabliert (Startlinie 27), die das gleiche T-DNA-Konstrukt trägt, jedoch bei allen Nachkommen nur eine teilweise Transgeninaktivierung aufweist.

Bei den beiden partiell inaktivierten Linien wurde eine von Generation zu Generation deutlich zunehmende Transgeninaktivierung beobachtet, so daß bei Versuchen stets Kontrollpflanzen der gleichen Generation mitkultiviert werden mußten, um eventuelle Veränderungen der Transgenexpression festzustellen.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Detektion von *GFP* wurden keine *GFP*-transgenen Linien für die durchzuführenden Versuche ausgewählt.

3.1.4 Charakterisierung der T-DNA-Insertionen der Luciferaselinien

Die Bestimmung der Anzahl unabhängig segregierender T-DNA-Insertionen bei Linien mit dem Konstrukt LUC 1 war meist durch die Analyse der Segregation der Luciferaseaktivität in der T2-Generation möglich. Bei den für das *Silencing*-Testsystem ausgewählten Linien mit dem Konstrukt LUC 4 konnte aufgrund der besonders starken Inaktivierung meist keine Luciferaseaktivität beobachtet werden. Versuche zur Analyse der Segregation der T-DNA-Insertionen durch Selektion transgener Nachkommen auf Kanamycinresistenz haben gezeigt, daß bei vielen Linien mit dem Konstrukt LUC 4 auch der zwischen die Luciferase-Expressionskassetten klonierte Selektionsmarker *NPT II* inaktiviert ist, sodaß keine Kanamycinresistenz ausgeprägt wird. Deshalb erfolgte die Kontrolle auf das Vorhandensein der Luciferasegene mittels PCR oder *Dot-Blot*-Hybridisierung. Die so erhaltenen Erkenntnisse über die wahrscheinliche Anzahl unabhängig segregierender T-DNA-Insertionen belegen, daß bei 3 der 6 ausgewählten Linien mehrere unabhängige Insertionsorte vorliegen (Tab. 3). Zur weiteren Charakterisierung der T-DNA-Insertionen der Linien mit dem Konstrukt LUC 4 wurden *Southern*-Analysen an genomischer DNA mit einer Luciferase-Sonde durchgeführt. Die dazu verwendete Endonuklease Hind III kann innerhalb jeder inserierten T-DNA zweimal schneiden, so daß pro unabhängigem Insertionsort je ein Fragment mit

konstanter Größe (4,6 kb) und ein vom Insertionsort abhängiges Fragment variabler Größe entsteht (Abb. 4 A). Beide Fragmente enthalten jeweils 2 Luciferase-Expressionskassetten und sollten im Fall einer Einzelinsertion auf dem *Southern-Blot* mit gleicher Intensität erscheinen. Die Anzahl der beobachteten variablen Fragmente gibt normalerweise Aufschluß über die wahrscheinliche Anzahl von T-DNA-Insertionen.

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Anzahl unabhängig segregierender T-DNA-Insertionen in ausgewählten Linien mit dem Konstrukt LUC 4.

Bezeichnung der Ausgangslinie	Größe der untersuchten Population	Anzahl transgener Pflanzen	Angenommene Segregation: WT/Transgen	Wahrscheinliche Anzahl Insertionsorte
Startlinie 2	52	37	1 : 3	1
Startlinie 6	34	31	1 : 15	2
Startlinie 7	15	12	1 : 3	1
Startlinie 8	15	15	$\geq 1 : 15$	≥ 2
Startlinie 9	141	109	1 : 3	1
Startlinie 12	72	72	$\geq 1 : 63$	≥ 3

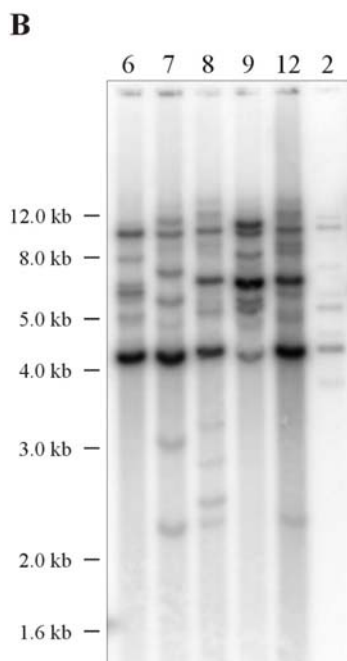
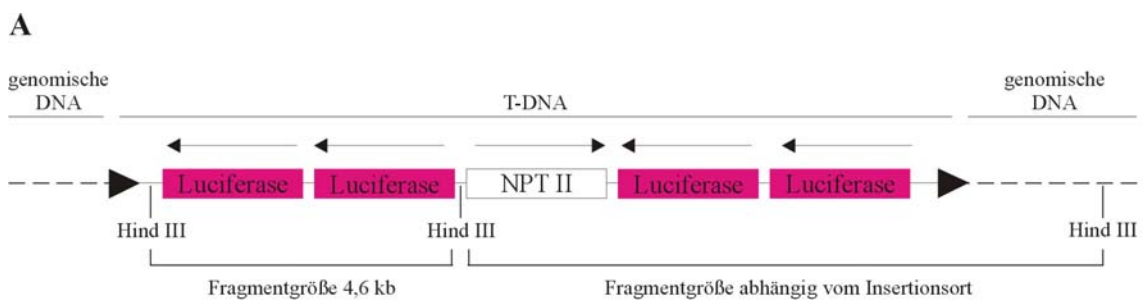


Abb. 4: Untersuchung der T-DNA-Insertionen der ausgewählten TGS-Linien. Dargestellt sind die Positionen der Hind III-Schnittstellen innerhalb des T-DNA-Konstrukts LUC 4 (A) sowie *Southern*-Analysen an genomischer DNA der 6 für die weiteren Untersuchungen ausgewählten TGS-Linien mit Konstrukt LUC 4 unter Verwendung der Endonuklease Hind III (B). Die Membran wurde mit einer Luciferase-Sonde hybridisiert. Nach Restriktion entsteht ein T-DNA-internes Hind III-Fragment mit 2 Luciferase-Expressionskassetten (ca. 4,6 kb). Durch Einbeziehung einer genomischen Hind III-Schnittstelle entsteht pro unabhängigem Insertionsort ein weiteres Fragmente mit 2 Luciferase-Expressionskassetten und variabler Größe (größer 5,0 kb).

Allerdings erlaubt die Komplexität der mit den ausgewählten Linien erhaltenen Fragmentmuster mit zahlreichen Banden unterschiedlicher Intensität keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Anzahl der T-DNA-Insertionen (Abb. 4 B). Die große Anzahl variabler Fragmente suggeriert das Vorhandensein zahlreicher T-DNAs bei allen untersuchten Linien. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den als gesichert anzunehmenden Ergebnissen der Segregationsanalysen (Tab. 3). Eine mögliche Ursache für die komplexen Fragmentmuster ist das Auftreten abhängiger Mehrfachinsertionen (Tandeminsertionen). Eine Unterscheidung abhängiger und unabhängiger Insertionen ist mittels *Southern*-Analyse nicht mit Sicherheit möglich, jedoch erlaubt der Vergleich der *Southern*-Analysen mit den Ergebnissen der Segregationsanalysen Rückschlüsse hinsichtlich des Bestehens von Tandeminsertionen. In den Linien 2, 7 und 9, bei denen die Analyse der Transgensegregation nur einen unabhängig segregierenden Insertionsort dokumentiert, kann das Auftreten mehrerer variabler T-DNA-Fragmente die Folge von Tandeminsertionen sein. Ein weiterer Hinweis auf Tandeminsertionen ist das Auftreten einer ca. 10 kb-Bande mit relativ hoher Intensität. Unter der Annahme des Vorhandenseins einer Tandeminsertion wären Größe und Intensität dieses Restriktionsfragments sehr einfach durch eine Zusammenlagerung der Enden von zwei T-DNAs zu erklären. Dieses Fragment konnte bei allen untersuchten Linien mit besonders starker Transgeninaktivierung beobachtet werden (Abb. 4 B).

3.1.5 Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation

Zum quantitativen Nachweis, ob an den inaktivierten Luciferasegenen noch Transkription von Luciferase-mRNA erfolgt, wurden *Nuclear Run-On-Transcription Assays* durchgeführt. Die Methode erlaubt die Unterscheidung zwischen transkriptioneller (TGS) und posttranskriptioneller (PTGS) Inaktivierung der Luciferasegene. Als Positivkontrolle mit transkriptionsaktiven Luciferase- und *NPT II*-Genen diente die nicht inaktivierte Linie 15 (Konstrukt LUC 1). Als Kontrolle für eine erfolgreiche *Run-On*-Transkription wurden der konstitutiv exprimierte *Arabidopsis*-Elongationsfaktor 1 α und ein Fragment der Kartoffel-25S-rRNA verwendet. Im Ergebnis konnte gezeigt werden, daß die Luciferase-Reportergene in 3 der 4 untersuchten Linien mit Konstrukt LUC 4 transkriptionell inaktiviert sind, da die Synthese von Luciferase-mRNA drastisch reduziert bzw. nicht nachweisbar ist (Abb. 5 A). Bei den Linien 6 und 7 ist darüber hinaus auch die Expression des

Selektionsmarkers *NPT II* transkriptionell inaktiviert, während bei den Linien 8 und 9 noch *NPT II*-mRNA-Synthese erfolgt.

Zur Untersuchung der Transkriptakkumulation wurden *Northern*-Analysen an Gesamt-RNA der inaktivierten Linien durchgeführt. Im Vergleich zu der Kontrollinie 15 ist in den inaktivierten Linien kein Nachweis von Luciferase-mRNA möglich (Abb. 5 B). In einigen der untersuchten Einzelpflanzen der Luciferase-*Silencing*-Linien wird noch *NPT II*-mRNA akkumuliert, jedoch ist die Expression im Vergleich mit der Kontrollinie 15 drastisch reduziert. Dieses Ergebnis bestätigt den bei den Segregationsanalysen beobachteten Verlust der Kanamycinresistenz bei den ausgewählten Linien.

Für die Ausgangslinie 8 ist posttranskriptionelle Inaktivierung anzunehmen, da eindeutig Luciferase-mRNA-Synthese stattfindet, jedoch keine Transkriptakkumulation erfolgt.

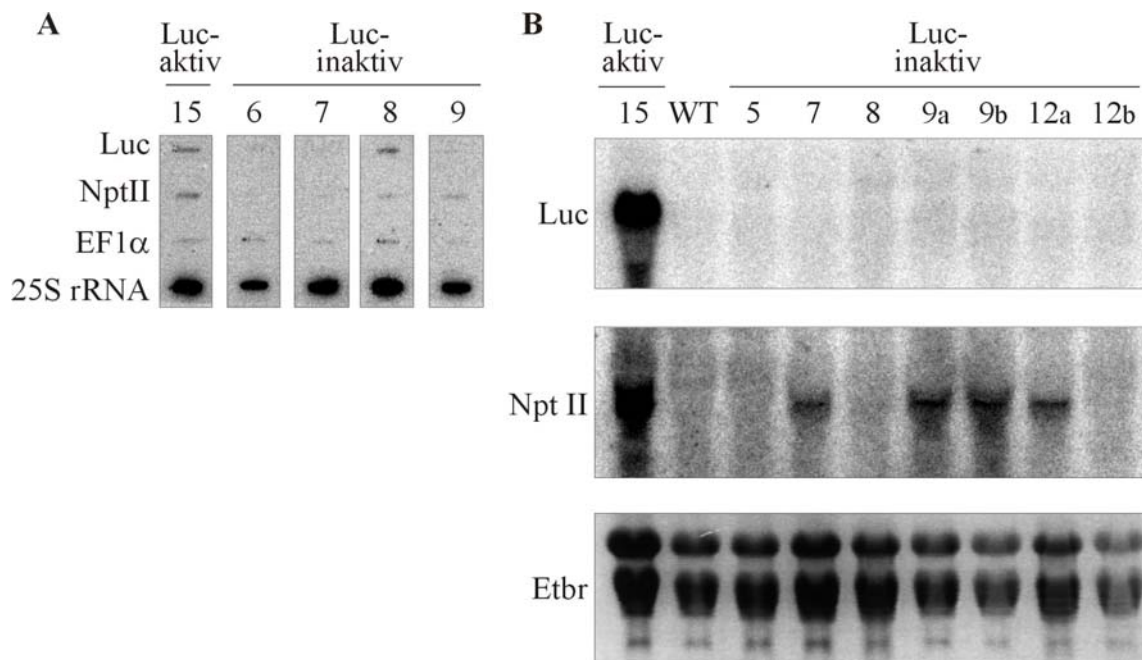


Abb. 5: Analysen zur Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation von Luciferase- und *NPT II*-mRNA. Die Untersuchungen wurden an einer Luciferase exprimierenden Linie und inaktivierten Linien mittels *Run-On*-Transkription (**A**) und *Northern*-Analysen (**B**) durchgeführt. Für die *Run-On*-Transkription wurde Material mehrerer T3-Pflanzen gepoolt. Die *Northern*-Analysen erfolgten mit RNA von Einzelpflanzen der T3-Generation. Die *Run-On*-Transkriptionsexperimente weisen mit Ausnahme der Linie 8 auf eine transkriptionelle Inaktivierung hin, da keine Luciferase-mRNA-Synthese stattfindet. In den inaktivierten Linien ist mittels *Northern*-Analyse kein Nachweis von Luciferase-mRNA möglich. Nur in einigen der Luciferase-*Silencing*-Linien wird noch *NPT II*-mRNA akkumuliert.

3.1.6 Reaktivierung der Transgenexpression

Zum Nachweis der prinzipiellen Reaktivierbarkeit der Transgenexpression in den inaktivierten Linien wurden Experimente mit zwei verschiedenen Hemmstoffen durchgeführt, die als spezifische Inhibitoren für bestimmte DNA- bzw. Chromatin-modifizierende Proteine angesehen werden. Zur Hemmung der DNA-Methyltransferase wurde 5-Aza-Cytidin in Konzentrationen von 25 μM und 50 μM eingesetzt. Bei beiden Konzentrationen wurde eine starke Reaktivierung der Luciferase-Expression beobachtet (Abb. 6). Zur Inhibierung der Histondeazetylase wurde Trichostatin A in Konzentrationen von 0,3 μM und 5 μM verwendet. Insbesondere bei 5 μM Trichostatin A reagierten die Versuchspflanzen mit deutlich reduziertem Wachstum, jedoch konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Reaktivierung der Transgenexpression beobachtet werden.

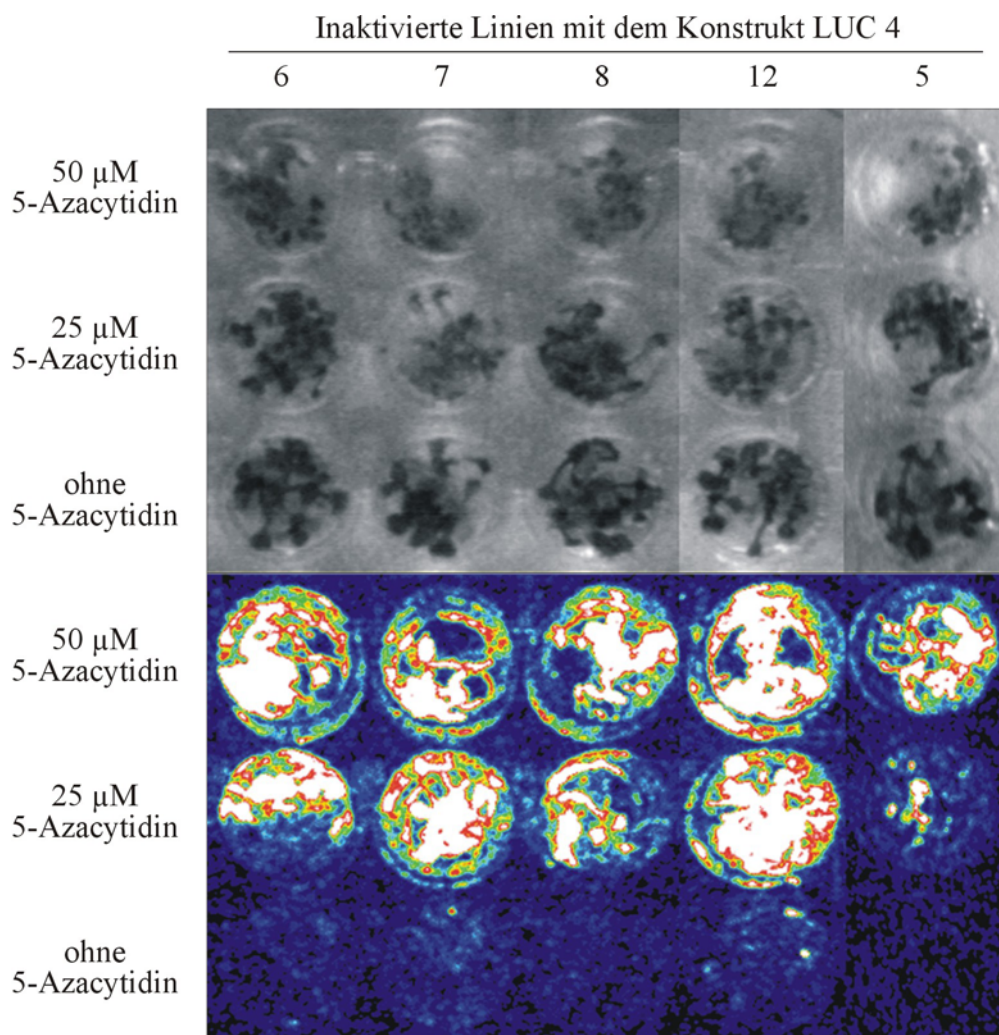


Abb. 6: Reaktivierung der Transgenexpression bei inaktivierten Luciferaselinien.

Durch die Kultivierung inaktivierter Luciferaselinien auf MS-Medium mit 20 μM bzw. 50 μM 5-Azacytidin ist eine Reaktivierung der Luciferaseexpression möglich.

3.1.7 DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung der Expressionskassetten wurden *Southern*-Analysen an genomischer DNA der transgenen Pflanzen unter Verwendung der methylierungssensitiven Endonukleasen Msp I und Hpa II durchgeführt. Die Restriktion der DNA erfolgt hierbei in Abhängigkeit von der Methylierung der Cytosin-Nukleotide innerhalb der Erkennungssequenz der Nukleasen. Beide Restriktionsenzyme besitzen die gleiche Erkennungssequenz CCGG, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Sensitivität gegenüber 5-Methyl-Cytosin. Hpa II schneidet bereits nicht mehr, wenn eines der beiden Cytosin-Nukleotide methyliert ist, während Msp I gegen Methylierung am zweiten Cytosin unempfindlich ist und nur bei Methylierung des ersten Cytosin-Nukleotids nicht schneidet. Entsprechend der nur 4 Nukleotide langen Erkennungssequenz entstehen im Ergebnis der Restriktion unmethylierter DNA mit diesen Enzymen bevorzugt relativ niedermolekulare Fragmente (< 1 kb). Für den Fall einer erhöhten DNA-Methylierung können die verwendeten Endonukleasen nicht an allen möglichen Schnittstellen die DNA schneiden, so daß deutlich höhermolekulare Restriktionsfragmente entstehen.

Im Ergebnis der Untersuchung des Methylierungsstatus der Expressionskassetten konnte gezeigt werden, daß die DNA der Luciferasegene in den inaktivierten Linien in hohem Maß methyliert ist (Abb. 7 A). Bei Restriktion mit Hpa II ist der überwiegende Teil der Fragmente größer als 2,3 kb, d. h. Hpa II ist aufgrund der DNA-Methylierung meist nicht in der Lage an den 10 möglichen Schnittstellen innerhalb des Luciferase-Gens der Expressionskassetten zu schneiden. Unter Verwendung der Endonuklease Msp I hat der überwiegende Teil der Fragmente eine Größe von weniger als 2,3 kb, d. h. Msp I kann aufgrund der DNA-Methylierung meist nur bei einigen der 10 möglichen Schnittstellen schneiden. Bei den nicht inaktivierten Linien ist die DNA der Luciferase-Gene weitgehend unmethyliert, so daß vor allem die bei vollständiger Restriktion zu erwartenden Luciferasefragmente von 376 bp und 250 bp zu erkennen sind. Die DNA des als Selektionsmarker verwendeten *NPT II*-Gens, das bei den inaktivierten Linien von den hypermethylierten Luciferasegenen flankiert wird, ist, wie in nicht inaktivierten Linien, stets nahezu unmethyliert (Abb. 7 B). Das Fehlen des 276 bp-*NPT II*-Fragments bei der nicht inaktivierten Linie 10 (Abb. 7 B) könnte durch eine mutierten Restriktionsschnittstelle, eine unvollständige T-DNA-Insertion oder eine Rekombination zwischen 2 T-DNAs erklärt werden.

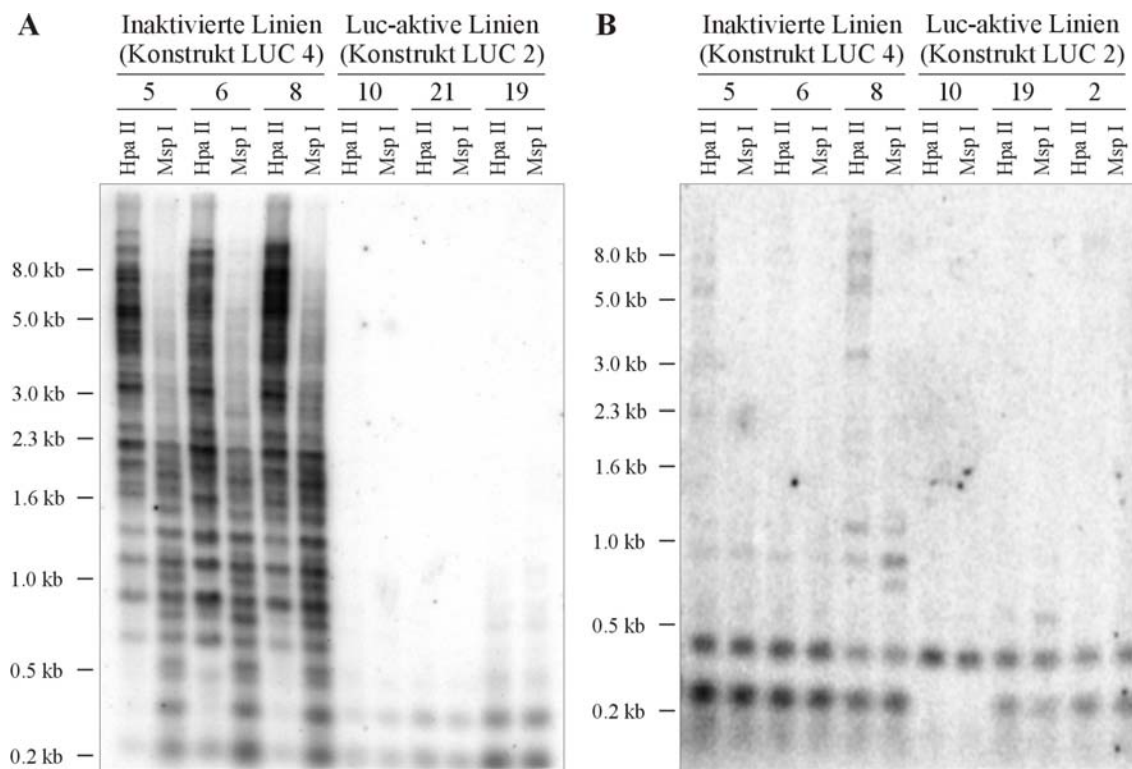


Abb. 7: DNA-Methylierung der Luciferasegene und des Selektionsmarkers *NPT II*. Dargestellt sind *Southern*-Analysen an genomischer DNA inaktivierter und Luciferase exprimierender Linien (M3-Generation) unter Verwendung der methylierungssensitiven Endonukleasen Hpa II und Msp I. (A): Die Membran wurde mit einer Luciferase-Sonde hybridisiert. Im Vergleich zu nicht inaktivierten Linien ist in den von TGS betroffenen Linien die DNA der Luciferasegene in hohem Maß methyliert. (B): Die Membran wurde mit einer *NPT II*-Sonde hybridisiert. In den inaktivierten Linien ist im Vergleich zu den Luciferase exprimierenden Linien keine erheblich erhöhte Methylierung der *NPT II*-Gene nachweisbar.

Bei der partiell inaktivierten Startlinie 2 wurde eine von Generation zu Generation fortschreitende Transgeninaktivierung beobachtet. Pflanzen der T3-Generation dieser Linie zeigen homogen eine deutlich höhere Luciferaseaktivität als Pflanzen der T5-Generation (Abb. 8 A). Die Luciferasegene dieser Linie sind ebenfalls in erheblichem Maß methyliert, jedoch sind in der T3-Generation im Gegensatz zu den stark inaktivierten Linien (Abb. 7 A) noch keine extrem hochmolekularen Fragmente (> 3 kb) nachweisbar (Abb. 8 B). Im Vergleich mit der T3-Generation ist in der T5-Generation eine deutlich höhere Methylierung der Luciferasegene mit Restriktionsfragmenten > 5 kb zu beobachten (Abb. 8 B). Demnach geht die bei dieser Linie beobachtete, von Generation zu Generation fortschreitende Transgeninaktivierung mit einer zunehmenden DNA-Methylierung einher.

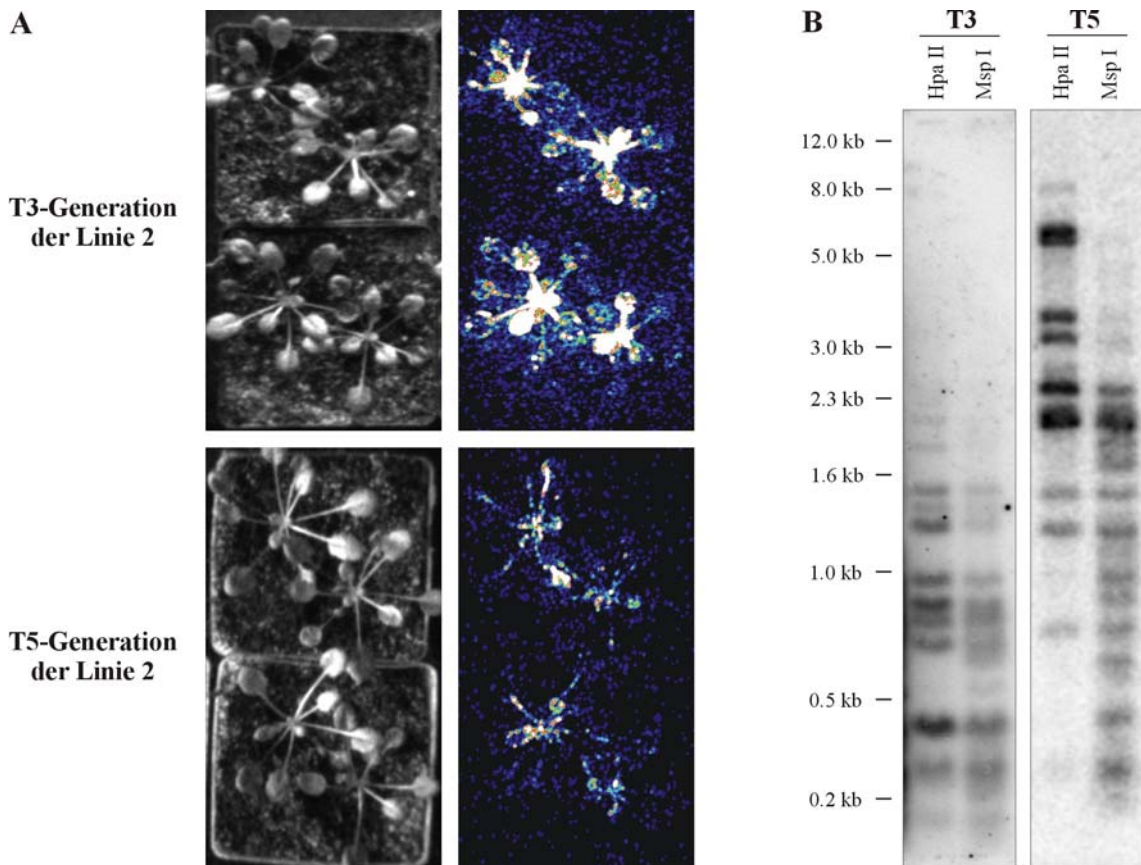


Abb. 8: Fortschreitende Transgeninaktivierung und zunehmende DNA-Methylierung bei der partiell inaktivierten Linie 2. Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität von Pflanzen der partiell inaktivierten Linie 2 (Konstrukt LUC 4) in der T3- und T5-Generation (A) sowie *Southern*-Analysen an genomischer DNA dieser Pflanzen unter Verwendung der methylierungssensitiven Endonukleasen Hpa II und Msp I (B). Die Membran wurde mit einer Luciferase-Sonde hybridisiert. Pflanzen der T3-Generation dieser Linie zeigten deutlich mehr Luciferaseaktivität als Pflanzen der T5-Generation. Die Luciferasegene dieser Linie waren in der T3-Generation noch wesentlich weniger methyliert als in der T5-Generation.

3.2 Induktion und Selektion von Suppressormutanten für TGS

3.2.1 Mutagenese

Zur Induktion von TGS-Suppressormutanten wurde eine chemische Mutagenese mit EMS durchgeführt. Dazu wurden jeweils ca. 1000 Samen von 5 stark inaktivierten Luciferaselinien (Ausgangs- bzw. Startlinien 6, 7, 8, 9 und 12) mit EMS behandelt. Die mutagenisierten Samen jeder Ausgangslinie wurden zu je ca. 100 Samen auf Erde ausgesät, so daß nach dem Abreifen der Pflanzen die Samen der M1 (F1-Generation der Mutagenese) in insgesamt 50 Pools vorlagen. Die Pflanzen der M1-Generation wurden unter Langtagbedingungen kultiviert. Eine Reduzierung der Keimrate der mutagenisierten Samen im Vergleich zu nicht mutagenisiertem Saatgut wurde nicht festgestellt. Innerhalb der M1-Generation konnten keine Veränderungen wie z.B. gelbe

oder weiße Keimlinge beobachtet werden, die Rückschlüsse auf eine erfolgreiche oder auch zu starke Mutagenese zugelassen hätten.

3.2.2 Mutantenselektion

Die Selektion von Suppressormutanten für TGS erfolgte in der M2-Generation. Aus der M1-Generation können nur Mutanten mit dominantem bzw. intermediärem Erbgang identifiziert werden. Durch die Analyse der M2-Generation ist gleichzeitig die Isolation von Mutanten mit rezessivem Erbgang möglich.

Zur Selektion wurden aus jedem der 50 Pools mit Samen der M1-Generation ca. 1000 Samen auf Erde ausgesät. Innerhalb der M2-Generation konnten als erster Hinweis auf eine erfolgreiche Mutagenese ca. 3 % gelbe oder weiße Keimlinge beobachtet werden. Nach einer Kulturdauer von 14 bis 20 Tagen unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen mit Luciferin besprüht und hinsichtlich ihrer Luciferaseexpression untersucht. Pflanzen mit im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslinie erhöhter Luciferaseexpression wurden selektiert. Insgesamt wurden aus den ca. 50 000 untersuchten Nachkommen (M2-Generation) der mutagenisierten Linien 159 Pflanzen mit erhöhter Transgenaktivität isoliert. Tabelle 4 gibt Auskunft über die Anzahl der aus den einzelnen Ausgangslinien der Mutagenese selektierten putativen Mutanten sowie über deren Verteilung auf Pools unabhängiger M1-Pflanzen.

Tab. 4: Anzahl der aus den einzelnen Ausgangslinien selektierten putativen Suppressormutanten.

Nummer der Ausgangslinie	6	7	8	9	12
Anzahl putativer Mutanten	23	48	8	38	42
Verteilung der Mutanten auf Anzahl unabhängiger Pools	6	8	4	6	6

Die Benennung der isolierten Mutanten erfolgte entsprechend dem Schema: Mutantenlinie X/Y/Z, wobei X für die Nummer der Ausgangslinie, Y für die Nummer des Pools innerhalb dieser Ausgangslinie und Z für die Nummer der Mutante innerhalb dieses Pools steht. Nur von 98 der 159 selektierten putativen Suppressormutanten wurden Samen erhalten, da die Blüten zahlreicher Pflanzen nicht fertil waren. Aufgrund der dennoch hohen Anzahl selektierter putativer Mutanten wurden keine Versuche zur

Erhaltung der infertilen Pflanzen durch Kreuzung gegen die jeweilige Ausgangslinie durchgeführt.

Um die Beobachtungen an den selektierten putativen Mutanten zu verifizieren, wurden die Samen von 54 aufgrund der erhöhten Luciferaseexpression und z.T. festgestellter pleiotroper Phänotypen besonders interessanter Pflanzen erneut ausgesät. Im Ergebnis dieser Untersuchungen an der M3-Generation wurden 19 Linien wegen ihrer bei allen Nachkommen beobachteten, im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslinie deutlich erhöhten Luciferaseaktivität zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Bei 17 Linien wurde entweder nur in wenigen M3-Pflanzen mehr Luciferaseaktivität festgestellt, oder die Transgenexpression war nur sehr gering erhöht. Die Nachkommen weiterer 18 Pflanzen zeigten bei dieser Analyse der M3-Generation keine erhöhte Transgenexpression im Vergleich zur entsprechenden Ausgangslinie. Die für die weitere Bearbeitung ausgewählten 19 putativen Mutanten verteilen sich auf 12 unabhängige Pools, so daß den beobachteten Veränderungen mit Sicherheit überwiegend unabhängige Mutageneseereignisse zugrunde liegen.

3.3 Charakterisierung der isolierten Suppressormutanten für TGS

3.3.1 Transgenexpression in den selektierten Mutanten

Untersuchungen an den nicht mutagenisierten Ausgangslinien und den selektierten Mutanten haben gezeigt, daß die Kulturbedingungen und vor allem das Alter der Pflanzen z.T. erheblichen Einfluß auf die Luciferaseaktivität hatten. Pflanzen einer Linie, die unter gleichen Kulturbedingungen angezogen wurden, zeigten stets gleichstarke Expression. Jedoch führten oft bereits geringfügige Abweichungen bei der Anzucht bzw. im Alter der Pflanzen zur Veränderung der Luciferaseaktivität. Deshalb erfolgten die Untersuchungen zur Transgenexpression an den selektierten Pflanzen ausschließlich im direkten Vergleich zu den entsprechenden Ausgangslinien der Mutagenese, die gleichzeitig in einer Pflanzschale mit den putativen Mutanten unter identischen Kulturbedingungen angezogen wurden. Aufgrund der beobachteten Schwankungen der Luciferaseexpression wurde auch auf die numerische Quantifizierung der Luciferaseaktivität der Mutanten im Vergleich zur Ausgangslinie bzw. im Vergleich zu anderen Mutanten verzichtet. Als Mittel zur Charakterisierung der Transgenexpression der Mutantenlinien diente deshalb ausschließlich die Darstellung der Luciferaseaktivität mit Hilfe der Falschfarbenbilder des CCD-Kamerasystems. Dazu

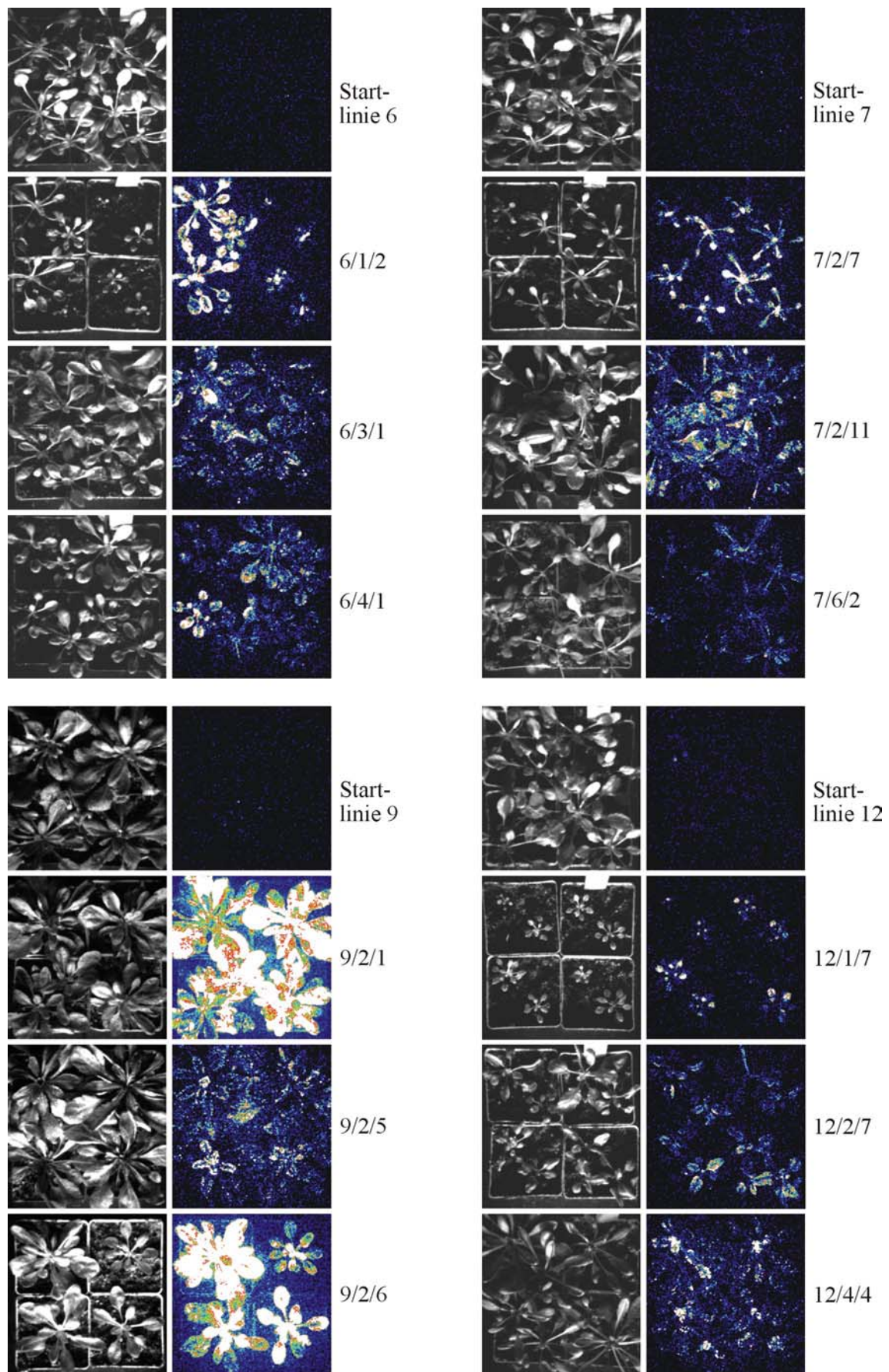


Abb. 9: Reaktivierung der Luciferaseaktivität bei selektierten TGS-Suppressormutanten.
Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität von 12 selektierten *Silencing*-Mutanten (M3-Generation) im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangslinien der Mutagenese.

wurden alle Messungen mit den gleichen Einstellungen des Systems durchgeführt (s. Kap. 2.2.16). In Abbildung 9 sind die zur Charakterisierung verwendeten Falschfarbenbilder der Luciferaseaktivität von 12 isolierten TGS-Suppressormutanten (M3-Generation) im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslinie gezeigt. Angaben zur Stärke der Luciferase-Reaktivierung in den bearbeiteten Linien und über z.T. gefundene spezifische Reaktivierungsmuster sind gemeinsam mit den anderen Daten zur Charakterisierung der Mutanten in Tabelle 5 zusammengefasst.

3.3.2 Kontrolle der T-DNA-Insertionen in den Mutantelinien

Mit genomischer DNA der für die weitere Bearbeitung ausgewählten 19 Mutantelinien wurden *Southern*-Analysen zur Kontrolle auf Vollständigkeit der T-DNA-Insertionen durchgeführt. Abbildung 10 zeigt eine *Southern*-Analyse mit drei aus der Ausgangslinie 9 und sechs aus der Ausgangslinie 12 selektierten *Silencing*-Mutanten im Vergleich mit den Fragmentmustern der jeweiligen Ausgangslinien.

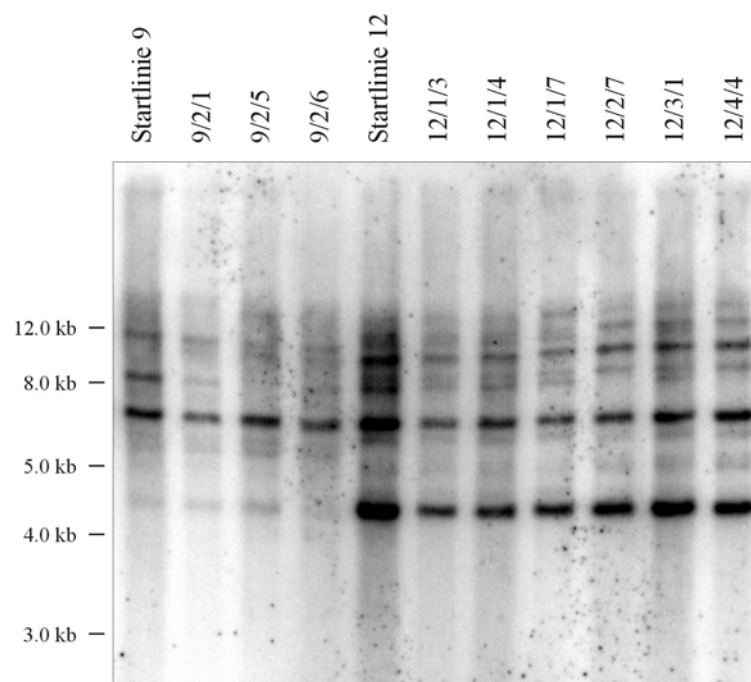


Abb. 10: Untersuchung der T-DNA-Insertionen bei den selektierten Mutanten. Dargestellt sind *Southern*-Analysen an genomischer DNA von 9 selektierten *Silencing*-Mutanten und den entsprechenden Ausgangslinien der Mutagenese unter Verwendung der Endonuklease Hind III. Die Membran wurde mit einer Luciferase-Sonde hybridisiert. Beim Vergleich der Restriktionsfragmentmuster der *Silencing*-Mutanten mit denen der zugehörigen Ausgangslinie sind keine signifikanten Veränderungen erkennbar.

Durch den Vergleich der mit der Endonuklease Hind III erhaltenen Restriktionsfragmentmuster der *Silencing*-Mutanten mit denen der entsprechenden

Ausgangslinie der Mutagenese konnte für keine der 19 Mutantenlinien eine deutliche Veränderung der Fragmentmuster der T-DNA-Insertionen gefunden werden. Somit kann eine Veränderung im Bereich der Architektur der inaktiven T-DNAs als Ursache für die erhöhte Transgenexpression in den Mutanten weitgehend ausgeschlossen werden.

3.3.3 DNA-Methylierungsstatus der Expressionskassetten in den Mutanten

Die DNA der Luciferasegene in den isolierten TGS-Suppressormutanten wurde im Vergleich zu den Ausgangslinien hinsichtlich eventueller Veränderungen im Methylierungsstatus überprüft. Einige der dazu durchgeführten *Southern*-Analysen sind in Abbildung 11 dargestellt. Bei 9 der 19 näher untersuchten Mutantenlinien wurde eine im Vergleich zur Ausgangslinie eindeutig verringerte DNA-Methylierung der Reportergene gefunden. Betroffen sind die Linien 6/1/2, 7/2/7, 7/2/11, 7/4/4, 9/2/1, 9/2/6, 12/1/3, 12/1/4 und 12/2/7. Außer bei den Linien 7/2/11 und 12/1/4 ist jeweils mit beiden der verwendeten methylierungssensitiven Endonukleasen Hpa II und Msp I eine Verringerung der DNA-Methylierung nachweisbar. Bei den Linien 7/2/11 und 12/1/4 ist nur mit Msp I eine Veränderung im Methylierungsstatus zu erkennen. In den restlichen 10 Mutantenlinien (6/3/1, 6/4/1, 6/8/1, 7/6/2, 9/2/4, 9/2/5, 12/1/1, 12/1/7, 12/3/1 und 12/4/4) ist mit dieser Methode trotz reaktiverer Luciferaseexpression keine Veränderung der DNA-Methylierung nachweisbar, d.h. die Transgenkopien sind weiterhin hypermethyliert.

3.3.4 Segregation der Mutantenphänotypen nach Kreuzung

Die meisten der ausgewählten Mutantenlinien zeigen neben der TGS-Suppression auch morphologische Veränderungen. Zur näheren Charakterisierung dieser eventuell pleiotropen Phänotypen und zur Kartierung der Mutationsorte wurden mit allen 19 im Ökotyp *Columbia* erzeugten Mutantenlinien Kreuzungen mit dem *Arabidopsis*-Ökotyp *Landsberg* und z.T. Rückkreuzungen gegen die jeweilige Ausgangslinie durchgeführt. Für diese Kreuzungen diente immer die Mutante als männlicher Kreuzungspartner. Aus der F₂-Generation der Kreuzungen mit *Landsberg* konnten für 16 der 19 Mutantenlinien wieder Pflanzen mit erhöhter Transgenexpression selektiert werden. Mit Ausnahme der

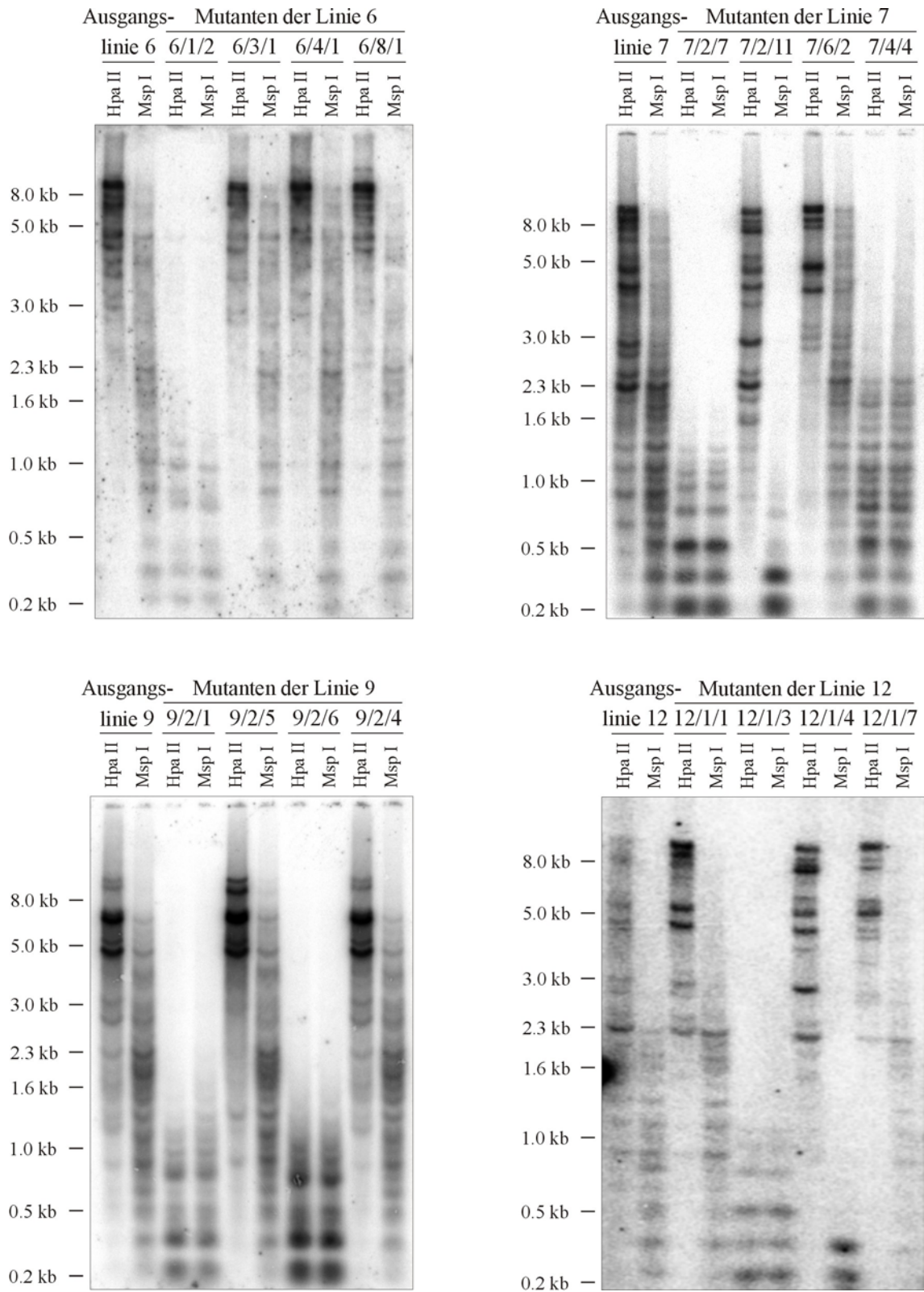


Abb. 11: DNA-Methylierung bei TGS-Suppressormutanten. Dargestellt sind *Southern*-Analysen an genomischer DNA von 4 Ausgangslinien der Mutagenese und von selektierten *Silencing*-Mutanten unter Verwendung der methylierungssensitiven Endonukleasen Hpa II und Msp I. Die Membranen wurden mit einer Luciferase-Sonde hybridisiert. Im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangslinien tritt bei einigen Mutantenlinien eine z. T. dramatische Verringerung der DNA-Methylierung der Luciferasegene auf.

Linie 12/2/7 zeigen alle Mutanten in der F1-Generation der Kreuzungen sowohl bei der TGS-Suppression als auch hinsichtlich der morphologischen Veränderungen einen rezessiven Erbgang. Die bei den Mutantenlinien 7/2/7, 7/4/4 und 12/1/1 beobachteten pleiotropen Phänotypen ähneln den für CLARK KENT-Mutanten beschriebenen morphologischen Veränderungen (Jacobson und Meyerowitz 1997). Untersuchungen zur Segregation dieser Phänotypen nach der Kreuzung mit *Landsberg* haben gezeigt, daß deren Vererbung rezessiv erfolgt, jedoch die in der F2-Generation gefundenen Aufspaltungsverhältnisse nicht den Mendelschen Gesetzen entsprechen, da wesentlich mehr als 25 % der Pflanzen die morphologischen Veränderungen zeigen.

Die bei den einzelnen Mutantenlinien beobachteten morphologischen Veränderungen, deren Vererbung sowie die Ergebnisse der Analysen zur Segregation der Luciferasereaktivierung nach Kreuzung mit *Landsberg* sind nachfolgend beschrieben und als Kurzübersicht gemeinsam mit den anderen Daten zur Charakterisierung der Mutanten in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die **Mutantenlinie 6/1/2** zeigt im Vergleich zu den meisten anderen selektierten Mutanten eine sehr starke Reaktivierung der Transgenexpression. Zusätzlich zum TGS-Suppressor-Phänotyp wurde bei etwa der Hälfte der M3-Pflanzen Zwergwuchs beobachtet. Aus 162 F2-Pflanzen einer Kreuzung der Mutante mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten wieder 28 Pflanzen mit hoher Luciferaseaktivität selektiert werden. Der morphologische Phänotyp (Zwergwuchs) trat in der F2-Generation dieser Kreuzung nicht auf.

Die **Mutantenlinie 6/3/1** zeigt im Vergleich zu den anderen selektierten Mutanten eine mittlere Reaktivierung der Transgenexpression. Die Trichome sind bei dieser Mutante unverzweigt und deutlich länger als beim Wildtyp (Abb. 12), vergleichbar mit dem STICHEL-Phänotyp (Ilgenfritz *et al.* 2003). Die Blüten der Mutante sind größer und die Blätter breiter als beim Wildtyp, oft in sich gedreht bzw. nach oben oder unten gewölbt (Abb. 13). Aus der F2-Generation einer Kreuzung der Mutante mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten keine Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp selektiert werden. Von den morphologischen Veränderungen wurde nur der Trichom-Phänotyp wieder aufgefunden.

Die Pflanzen der **Mutantenlinie 6/4/1** zeigen eine mittlere Reaktivierung der Luciferaseaktivität. Ein relativ schwacher morphologischer Phänotyp konnte bei dieser Mutante in Form einer veränderten Blattrosette mit leicht erhöhter Blattzahl und einem etwas helleren Blattgrün beobachtet werden. Aus einer Population von 162 F2-Pflanzen

einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* wurden wieder 16 Pflanzen mit reaktivierter Luciferase-Expression selektiert. Allerdings ist die Reaktivierung sehr viel schwächer als im ursprünglichen *Columbia*-Hintergrund. Der morphologische Phänotyp konnte in der F2-Generation dieser Kreuzung nicht wieder beobachtet werden.

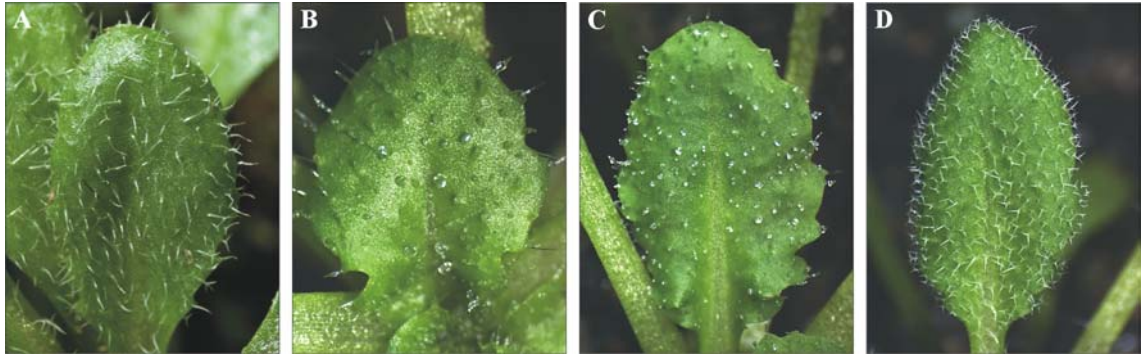


Abb. 12: Trichomphänotypen selektierter TGS-Suppressormutanten.

Die Abbildung zeigt junge Blätter der Mutanten 6/3/1 (A), 9/2/5 (B), 12/4/4 (C) und des Wildtyps *Columbia* (D). Im Vergleich mit den dreispitzigen Trichomen auf den Blättern des Wildtyps können bei den dargestellten Mutanten deutliche Veränderungen der Blattbehaarung beobachtet werden. Die Trichome der Mutante 6/3/1 sind unverzweigt, leicht gewellt und länger als beim Wildtyp. Der Trichomphänotyp der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 ist nahezu identisch. Die Trichome dieser Mutanten sind ebenfalls unverzweigt und bilden oft kugelförmige Strukturen aus.

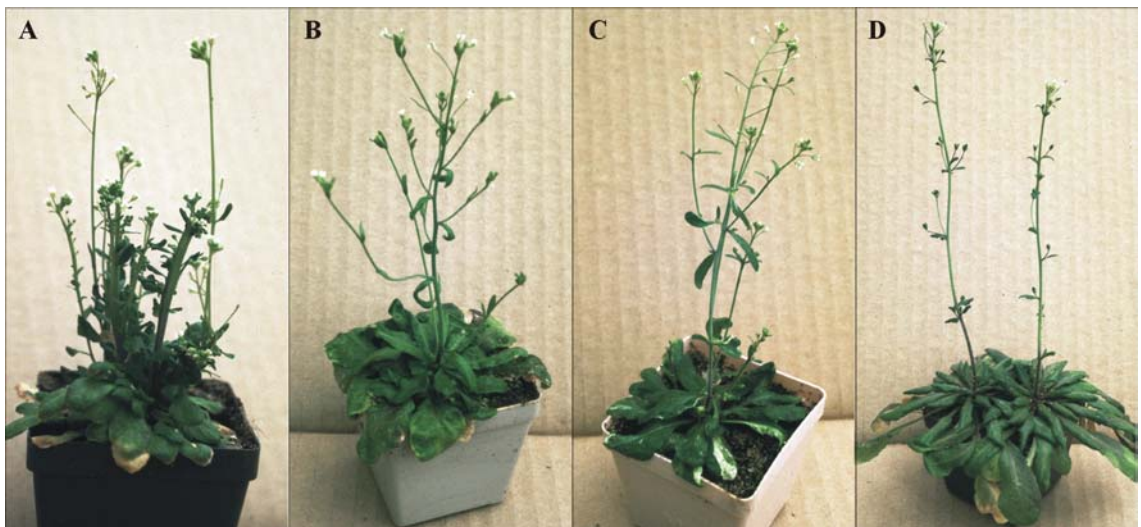


Abb. 13: Morphologische Phänotypen selektierter TGS-Suppressormutanten.

Dargestellt sind Pflanzen der M3-Generation der Mutanten 6/8/1 (A), 6/3/1 (B) und 12/3/1 (C) im Vergleich mit einer Pflanze des Wildtyps *Columbia* (D). Mutante 6/8/1: gestörte Apikaldominanz und Verwachsung mehrerer Blütenstengel miteinander; Mutante 6/3/1: Veränderte Blattform und Blütengröße; Mutante 12/3/1 weiß-grün varigierende Blattsektoren.

Die **Mutantenlinie 6/8/1** zeigt eine schwache Reaktivierung der Transgenexpression. Neben dem TGS-Suppressor-Phänotyp konnte ein starker pleiotroper Phänotyp beobachtet werden (Abb. 13). Die Blätter der Mutante sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich runder, haben nur einen relativ kurzen Blattstiel und sind meist asymmetrisch ausgebildet. Bereits bei sehr jungen Pflanzen mit etwa 5-10 Blättern kann oft eine

Teilung des Sprossmeristems beobachtet werden, so daß zwei oder mehr selbstständige Blattrosetten entstehen. In ähnlicher Weise kann sich auch der Blütenstengel in mehrere neue Blütenstengel teilen. Oft erfolgt diese Teilung jedoch nicht vollständig, so daß die Infloreszenz aus vielen miteinander verwachsenen Blütenstengeln aufgebaut ist (FACIATA-Phänotyp, Kaya *et al.* 2001). Die Mutante ist nur mäßig fertil. Aus 160 Pflanzen der F₂-Generation einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten 25 Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp selektiert werden. Diese 25 Pflanzen und 4 weitere ohne Luciferaseaktivität zeigten den beschriebenen pleiotropen Phänotyp. Unter Berücksichtigung der Segregation der Luciferase-Transgene nach der Kreuzung weisen diese Ergebnisse auf eine strenge Kopplung des TGS-Suppressor-Phänotyps und des pleiotropen Phänotyps hin.

Die **Mutantenlinie 7/2/7** zeigt eine sehr starke Reaktivierung der Transgenexpression und zahlreiche morphologische Veränderungen. Die Blätter sind im Vergleich zum Wildtyp sehr schmal und haben stark gesägte Blattränder. Oft entwickeln die Pflanzen mehr Organe als der Wildtyp, d.h. die Nebenblätter der Blattrosette werden frühzeitig (vor dem Blühbeginn) ausgebildet, die Infloreszenz ist dicht beblättert und die Blüten haben z. T. 5 oder 6 Blütenblätter (Wildtyp: 4) und 8 Staubgefäße (Wildtyp: 6) vergleichbar mit dem Phänotyp von CLARK KENT-Mutanten (Jacobson und Meyerowitz 1997). Die Pflanzen der Linie 7/2/7 zeigen sehr frühzeitig Seneszenz in Form absterbender Blätter und sind nahezu vollständig weiblich steril, so daß von der M₃-Generation keine Samen erhalten wurden. Aus 141 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten wieder 22 Pflanzen mit hoher Luciferaseaktivität selektiert werden. Diese selektierten Pflanzen und auch viele der Pflanzen ohne reaktivierte Luciferaseaktivität zeigten die beschriebenen morphologischen Phänotypen in verschiedenen Kombinationen und Ausprägungsstärken. Für keinen dieser Phänotypen wurde ein mendelnder Erbgang gefunden.

Die Pflanzen der **Mutantenlinie 7/2/11** zeigen eine mittlere Reaktivierung der Transgenexpression. Als morphologischer Phänotyp treten besonders große hellgrüne Blätter auf. Im Vergleich zum Wildtyp wachsen die Pflanzen schneller und werden größer. Aus 162 Pflanzen der F₂-Generation einer Kreuzung der Mutante mit dem Ökotyp *Landsberg* wurden 12 Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp selektiert. Allerdings ist die Reaktivierung der Luciferaseexpression im Vergleich zur primär selektierten Mutante mit *Columbia*-Hintergrund schwächer. Der morphologische Phänotyp wurde in der F₂-Generation dieser Kreuzung nicht wieder beobachtet.

Die bei der **Mutantenlinie 7/4/4** beobachtete Stärke der Luciferase-Reaktivierung, die morphologischen Veränderungen und die nicht-mendelnde Segregation dieser Merkmale sind denen der Mutantenlinie 7/2/7 sehr ähnlich. Allerdings sind die morphologischen Phänotypen nicht so extrem ausgebildet wie bei 7/2/7, und die Pflanzen sind etwas fertiler. Aus 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit *Landsberg* konnten wieder 25 Pflanzen mit hoher Luciferaseaktivität selektiert werden.

Die Pflanzen der **Mutantenlinie 7/6/2** zeigen nur eine schwache Reaktivierung der Luciferaseaktivität. Als morphologische Phänotypen wurden bei dieser Mutante ein deutlich früherer Blühbeginn sowie kürzere und verdickte Schoten beobachtet. Aus einer Population von 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* wurden wieder 24 Pflanzen mit reaktivierter Luciferase-Expression selektiert. Der "Frühblüh"-Phänotyp co-segregiert nicht mit der TGS-Suppression. Die veränderten Schoten wurden nicht wieder beobachtet.

Die **Mutantenlinie 9/2/1** zeigt im Vergleich zu den anderen selektierten Mutanten eine sehr starke Reaktivierung der Transgenexpression. Mögliche pleiotrope Phänotypen wie breitere und hellgrünere Blätter sind relativ schwach ausgebildet und wurden in der F₂-Generation einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* nicht wieder aufgefunden. Aus 162 F₂-Pflanzen dieser Kreuzung konnten wieder 31 Pflanzen mit hoher Luciferaseaktivität selektiert werden.

Die Reaktivierung der Luciferaseexpression ist bei der **Mutantenlinie 9/2/4** relativ schwach. Die Mutante ist durch einen extrem verzögerten Blühbeginn gekennzeichnet. Nach ca. 8 Wochen Kultur unter Kurztagbedingungen und weiteren 10 Wochen Kultur unter Langtagbedingungen entwickelten nur etwa 50 % der Pflanzen eine Infloreszenz. Zahlreiche Pflanzen gingen nach mehrmonatiger Kultur ein, bevor eine Blütenbildung einsetzte. Nach Kreuzung gegen den Ökotyp *Landsberg* wurden innerhalb einer Population von ca. 320 F₂-Pflanzen nur 3 Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp gefunden. Der "Spätblüh"-Phänotyp wurde bei etwa 25 % der F₂-Pflanzen beobachtet.

Die charakteristische, auf die Blattränder beschränkte Reaktivierung der Luciferaseexpression bei der **Mutantenlinie 9/2/5** ist in Abbildung 9 deutlich zu erkennen. Besonders ausgeprägt kann dieses Reaktivierungsmuster bei sehr jungen Blättern beobachtet werden, während die Luciferaseexpression in älteren Blättern geringer ist. Zur genaueren Charakterisierung dieses speziellen TGS-Suppressorphänotyps wurden Luciferase-Antikörperfärbungen von Blattquerschnitten angefertigt (Abb. 14) und F₂-Pflanzen einer Kreuzung der Mutante mit der partiell inaktivierten GUS-Linie 27

untersucht (Abb. 15). Zusätzlich zum TGS-Suppressorphänotyp zeigt die Mutante einen pleiotropen Phänotyp in Form von veränderter Blattbehaarung. Die Blätter der Mutante 9/2/5 tragen im Vergleich zu Blättern des Wildtyps *Columbia* deutlich weniger und abnormal ausgebildete Trichome (Abb. 12). Aus einer Population von 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit *Landsberg* wurden 40 Pflanzen mit dem Trichomphänotyp selektiert, von denen 32 den TGS-Suppressor-Phänotyp zeigten. Bei den restlichen 122 Pflanzen wurde kein TGS-Suppressor-Phänotyp gefunden. Unter Berücksichtigung der Segregation der Luciferasegene nach der Kreuzung weisen diese Ergebnisse auf eine strenge Kopplung der Luciferasereaktivierung und des Trichomphänotyps hin.

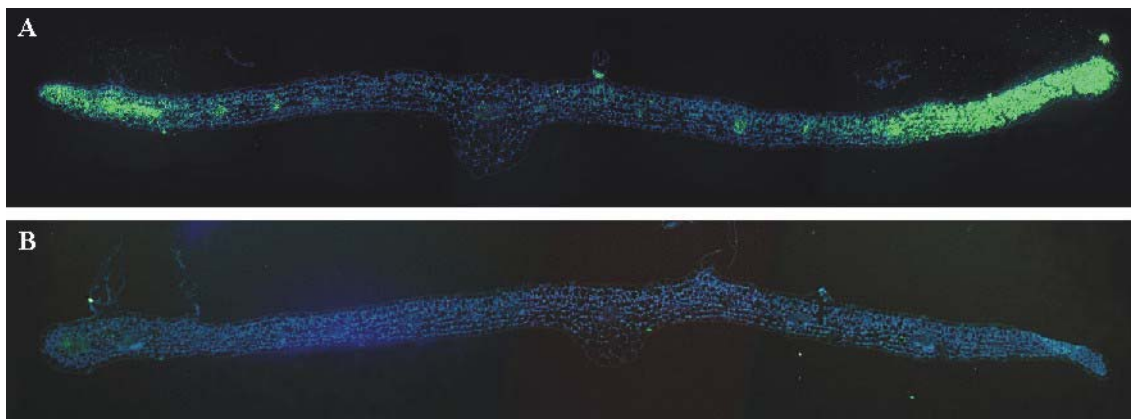


Abb. 14: TGS-Suppressor-Phänotyp der Mutante 9/2/5 im Blattquerschnitt.

Dargestellt sind Luciferase-Antikörperfärbungen an Blattquerschnitten der Mutante 9/2/5 (A) und der Ausgangslinie 9 (B). Bei der Mutante 9/2/5 ist das für diese Mutante charakteristische Luciferase-Reaktivierungsmuster im Randbereich der Blätter zu erkennen. Expression von Luciferase ist auch in den angeschnittenen Trichomen und den Leitgeweben des Blattes nachweisbar. In dem als Kontrolle verwendeten Blatt der Ausgangslinie 9 ist nahezu keine Luciferase vorhanden.

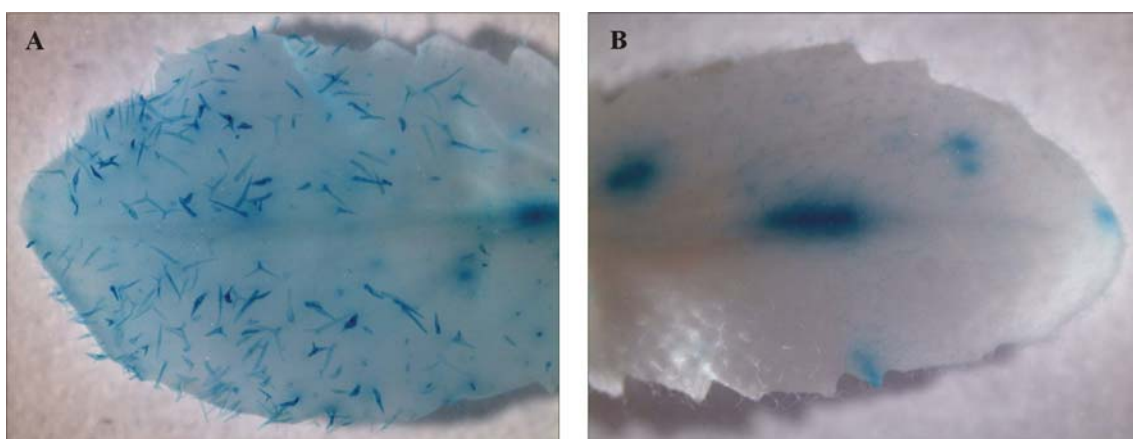


Abb. 15: TGS-Suppressor-Phänotyp der Mutante 9/2/5 bei der partiell inaktivierten GUS-Linie.

GUS-Aktivitätsfärbung an Blättern von Pflanzen der F₂-Generation einer Kreuzung der partiell inaktivierten GUS 3-Linie 27 mit der Mutante 9/2/5. Aus der F₂-Generation wurden Pflanzen selektiert, die den 9/2/5-Trichomphänotyp zeigen und das GUS-Silencing-System tragen (A). Als Kontrolle dienten GUS-transgene Pflanzen der F₂-Generation dieser Kreuzung ohne 9/2/5-Mutantenphänotyp (B). Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigen die F₂-Pflanzen mit veränderten Trichomen deutlich mehr GUS-Aktivität. Besonders hohe Aktivität wurde in den abnormalen Trichomen gefunden, während in Wildtyptrichomen nahezu keine GUS-Aktivität nachweisbar ist.

Die bei der **Mutantenlinie 9/2/6** beobachtete Stärke der Reaktivierung der Luciferaseaktivität und der relativ schwache pleiotrope Phänotyp sind identisch mit dem der Mutantenlinie 9/2/1. Aus 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit *Landsberg* konnten wieder 33 Pflanzen mit hoher Luciferaseaktivität selektiert werden.

Die **Mutantenlinie 12/1/1** zeigt eine sehr starke Reaktivierung der Luciferaseexpression. Als morphologische Phänotypen wurden bei den Pflanzen dieser Linie ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum und schmale Blätter mit stark gesägtem Blattrand beobachtet. Vergleichbar mit dem Phänotyp von CLARK KENT-Mutanten haben die Blüten der Mutante 12/1/1 oft mehr Blütenorgane. Aus 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten 24 Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp isoliert werden. Neben diesen 24 Pflanzen zeigten zahlreiche weitere der restlichen 138 Pflanzen die beschriebenen morphologischen Phänotypen, d.h. die Vererbung dieser Phänotypen folgt ähnlich wie bei den Mutantenlinien 7/2/7 und 7/4/4 nicht den Mendelschen Gesetzen.

Bei den Pflanzen der **Mutantenlinie 12/1/3** konnte eine besonders starke TGS-Suppression beobachtet werden. Darüber hinaus zeigt diese Mutante einige starke pleiotrope Effekte. Die Blätter sind sehr schmal und haben einen gesägten Blattrand. Die Pflanzen beginnen auch unter Kurztagbedingungen spätestens 4 Wochen nach der Aussaat mit der Blüte. Bereits vor Blühbeginn zeigen die Pflanzen deutliche Zeichen von Seneszenz in Form absterbender Blätter. Aus einer Population von 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* wurden erneut 18 Pflanzen mit starker Luciferase-Expression selektiert. Nur diese reSelektierten Mutanten zeigten den beschriebenen pleiotropen Phänotyp.

Die Pflanzen der **Mutantenlinie 12/1/4** zeigen eine starke Reaktivierung der Transgenexpression. Als pleiotroper Phänotyp treten gelbgrüne Blätter mit gesägtem Blattrand auf. Aus den F₂-Pflanzen einer Kreuzung der Mutante mit dem Ökotyp *Landsberg* konnten keine Pflanzen mit einem TGS-Suppressor-Phänotyp selektiert werden. Der pleiotrope Phänotyp konnte in der F₂-Generation dieser Kreuzung bei ca. 25 % der Pflanzen wieder beobachtet werden.

Die Pflanzen der **Mutantenlinie 12/1/7** zeigen eine mittelstarke Reaktivierung der Luciferaseaktivität. Als pleiotroper Phänotyp konnte bei dieser Mutante ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum und schmale, gelb gefärbte und sehr dicht behaarte Blätter mit grünen Blattadern und stark gesägtem Blattrand beobachtet werden. Aus einer Population von 162 F₂-Pflanzen einer Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg* wurden wieder 25 Pflanzen mit reaktivierter Luciferase-Expression

selektiert. Nur diese rezelektierten Mutanten zeigten den beschriebenen pleiotropen Phänotyp.

Die **Mutantenlinie 12/2/7** zeigt eine starke Reaktivierung der Transgenexpression. Als pleiotroper Phänotyp wurden breitere, gewellte und in sich gedrehte Blätter beobachtet. Weiterhin tritt ein Verlust der Apikaldominanz auf, so daß jede Pflanze mehrere Blattrossetten besitzt, aus denen sich jeweils eine relativ kurze Infloreszenz entwickelt. Als einzige der näher bearbeiteten Mutanten zeigt diese Linie einen intermediären Erbgang, d.h. auch in der F1-Generation einer Kreuzung der Mutante mit der Ausgangslinie bzw. mit dem Ökotyp *Landsberg* kann eine TGS-Suppression beobachtet werden. Auch der pleiotrope Phänotyp ist in der F1-Generation einer Kreuzung gegen die Ausgangslinie in etwas abgeschwächter Form vorhanden. Alle aus der F2-Generation dieser Kreuzung rezelektierten Pflanzen mit TGS-Suppressor-Phänotyp zeigten auch den beschriebenen pleiotropen Phänotyp. Im Gegensatz dazu wurden weder in der F1- noch in der F2-Generation einer Kreuzung mit *Landsberg* wieder Pflanzen mit diesem pleiotropen Phänotyp gefunden. Aufgrund des intermediären Erbgangs der TGS-Suppression konnten in der F2-Generation einer Kreuzung mit *Landsberg* die homozygoten Mutanten nicht identifiziert werden. Deshalb wurden zur Aufstellung einer Kartierungspopulation aus dieser Kreuzung alle Pflanzen selektiert, die keinen TGS-Suppressor-Phänotyp zeigten und somit für den gesuchten Mutationsort homozygot *Landsberg* sein sollten. Aus 162 F2-Pflanzen wurden 30 Pflanzen mit sehr geringer bzw. ohne Luciferaseaktivität erhalten. Diese Pflanzen wurden mit PCR auf das Vorhandensein des Luciferase-Transgens überprüft und zur Kartierung des Mutationsortes eingesetzt.

Die **Mutantenlinie 12/3/1** zeigt eine mittlere Reaktivierung der Transgenexpression. Als morphologischer Phänotyp treten gelblich-weiße Blattsektoren auf (Abb. 13). Aus 162 Pflanzen der F2-Generation einer Kreuzung mit *Landsberg* konnten wieder 14 Pflanzen mit dem TGS-Suppressor-Phänotyp selektiert werden. Auch der morphologische Phänotyp wurde erneut bei einigen Pflanzen beobachtet. Aufgrund der geringen Anzahl rezelektierter Mutanten ist jedoch eine Kopplung mit dem TGS-Suppressor-Phänotyp nicht erwiesen.

Das bei der **Mutantenlinie 12/4/4** beobachtete charakteristische Reaktivierungsmuster der Luciferaseexpression entlang der Blattränder, der pleiotrope Phänotyp der abnormalen Trichome (Abb. 12) und das Segregationsverhalten der untersuchten Merkmale sind identisch mit denen der Mutantenlinie 9/2/5.

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der selektierten Mutanten. Morphologische Phänotypen, die nicht mit dem TGS-Suppressor-Phänotyp co-segregieren bzw. für die keine Segregationsanalysen vorliegen sind in Klammern aufgeführt.

Bezeichnung der Mutantenlinie	Stärke der TGS-Suppression	DNA-Methylierung verändert im Motiv:	morphologische Phänotypen
6/1/2	+++	CpG + CpNpG	(z.T. Zwergwuchs)
6/3/1	++	-	(unverzweigte Trichome; gewellte Blätter; größere Blüten)
6/4/1	++	-	-
6/8/1	+	-	Runde asymmetrische Blätter; FACIATA-Phänotyp
7/2/7	+++	CpG + CpNpG	(schmale gesägte Blätter; mehr Organe; Fertilität reduziert)
7/2/11	++	CpNpG	-
7/4/4	+++	CpG + CpNpG	(schmale gesägte Blätter; mehr Organe; Fertilität reduziert)
7/6/2	+	-	-
9/2/1	+++	CpG + CpNpG	-
9/2/4	+	-	(spätblühend)
9/2/5	++	-	abnormale Trichome
9/2/6	+++	CpG + CpNpG	-
12/1/1	+++	-	(schmale gesägte Blätter; fehlende Blütenblätter; langsames Wachstum)
12/1/3	+++	CpG + CpNpG	Schmale gesägte Blätter; frühblühend
12/1/4	+++	CpNpG	(gelbgrüne Blätter)
12/1/7	++	-	Schmale gelbe Blätter; langsames Wachstum
12/2/7	+++	CpG + CpNpG	Breite gewellte und gerollte Blätter; gestörte Apikaldominanz
12/3/1	++	-	(weiße variegierende Blattsektoren)
12/4/4	++	-	abnormale Trichome

3.4 Kartierung der Mutationsorte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit 15 der 19 ausgewählten Mutantenlinien Versuche zur Kartierung des Mutationsortes durchgeführt. Als Kartierungspopulation dienten die aus der F2-Generation der Kreuzungen gegen den *Arabidopsis*-Ökotyp *Landsberg* wieder selektierten Pflanzen mit erhöhter Luciferaseexpression. Für die Mutantenlinien 6/3/1, 7/6/2, 9/2/4 und 12/1/4 konnten keine oder nicht genügend solche Pflanzen selektiert werden, so daß keine Kartierung der Mutationsorte möglich war. Im Ergebnis der Kartierung gelang für 15 Mutantenlinien die Bestimmung des wahrscheinlichen Mutationsortes. Die Ergebnisse der Kartierung sind in Tabelle 6 zusammengefaßt und zur besseren Übersicht in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Der Aufbau der

Kartierungspopulationen und die Kartierung der Mutationsorte der Mutanten 6/4/1, 7/2/11, 7/4/4 und 12/3/1 wurde von Dr. Ursula Niesbach-Klösgen durchgeführt.

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Kartierung der Mutationsorte.

Bezeichnung der Mutante	Chromosom	Mutationsort ca. bei	Größe der Kartierungspopulation
6/1/2	5	130 cM	20
6/4/1	3	36 cM	16
6/8/1	3	26 cM	118
7/2/7	5	105 cM	42
7/2/11	1	110 cM	47
7/4/4	5	100 cM	25
9/2/1	5	135 cM	31
9/2/5	2	70 cM	141
9/2/6	5	135 cM	33
12/1/1	5	110 cM	24
12/1/3	2	35 cM	18
12/1/7	5	68 cM	25
12/2/7	5	138 cM	20
12/3/1	5	107 cM	67
12/4/4	2	70 cM	72

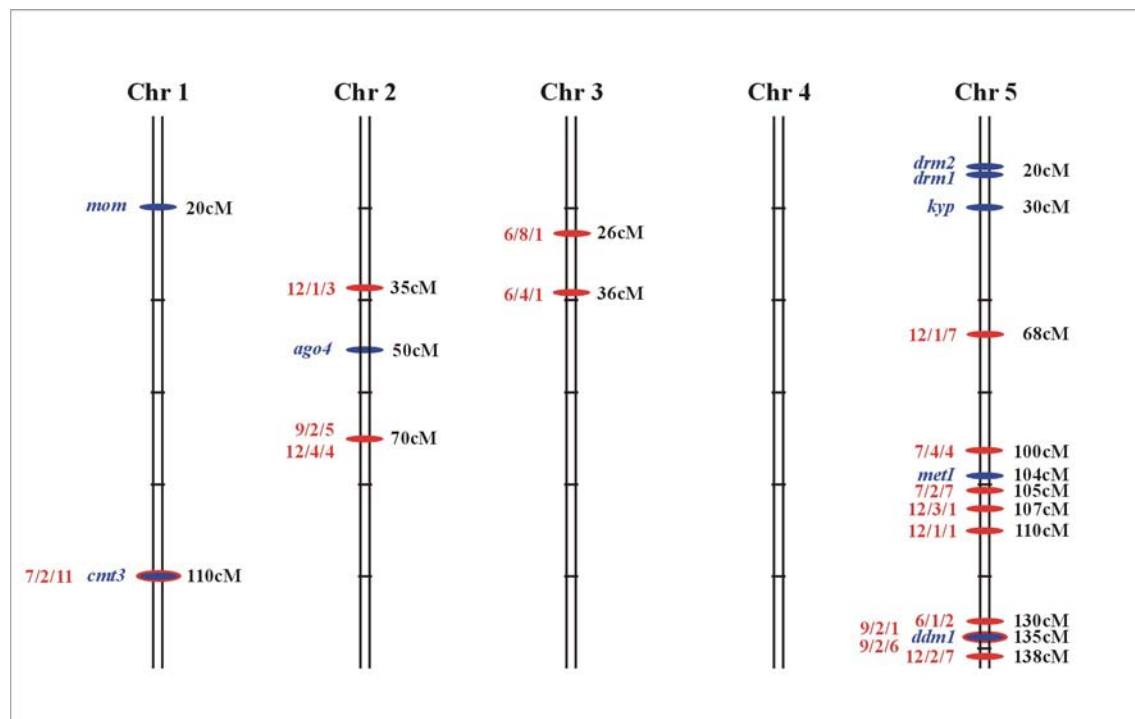


Abb. 16: Übersicht zu den Ergebnissen der Kartierung. Dargestellt ist die chromosomale Lokalisation der wahrscheinlichen Mutationsorte der 15 erfolgreich kartierten Mutanten im Vergleich zu den Loci der bisher bekannten TGS-Suppressormutanten *mom*, *cmt3*, *ago4*, *drm1*, *drm2*, *met1* und *ddm1*.

3.5 Identifizierung der Mutationsorte der allelen Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Im Ergebnis der Kartierung der Mutationsorte wurde festgestellt, daß die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 am gleichen Locus kartieren. Da beide Mutanten darüber hinaus sowohl den gleichen charakteristischen TGS-Suppressorphenotyp als auch den gleichen pleiotropen Phänotyp zeigen, wurde vermutet, daß 9/2/5 und 12/4/4 allele Mutationen sind. Diese Vermutung konnte durch die weitere Eingrenzung des Mutationsortes bei beiden Mutanten auf einen Bereich von 260 kb erhärtet werden. Dazu wurde eine Kartierungspopulation von 141 Pflanzen der Linie 9/2/5 und 72 Pflanzen der Linie 12/4/4 untersucht. Die für die Feinkartierung verwendeten PCR-Marker und die jeweilige Anzahl rekombinanter Chromosomen ist in Abbildung 17 dargestellt. Zur weiteren Suche nach dem mutierten Gen wurden die Annotierungsdaten genutzt, die im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts erhalten wurden (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000) (<http://www.arabidopsis.org/>). Innerhalb des durch die innersten noch rekombinanten SSLP-Marker eingegrenzten Bereiches wurden im *Arabidopsis*-Genomprojekt 66 Loci identifiziert (Abb.17). Die Auswertung der Annotierungsdaten dieser Loci hinsichtlich einer möglichen Relevanz für die Regulation von TGS ergab nur wenige Loci mit einer entsprechend interessanten Annotierung. Der aufgrund der Annotierung als DNA-bindendes Protein vom WRKY-Typ und der zentralen Lage innerhalb des eingegrenzten Bereiches besonders interessante Locus F3G5.5 (At2g37260) wurde hinsichtlich der vorhandenen mRNA-Menge in den Mutanten untersucht. Dazu wurden unter Beachtung der annotierten Exon-Intron-Struktur die Primer WRKY F3G5 F und WRKY F3G5 R entworfen, mit denen ein 409 bp-Fragment der für den Locus F3G5.5 vorausgesagten mRNA amplifiziert werden kann. Die unter Verwendung dieser Primer durchgeführten RT-PCR-Analysen zeigen, bezogen auf die Transkriptakkumulation, einen deutlichen Unterschied zwischen WT-*Columbia* und den beiden Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 (Abb.18). Die in beiden Mutanten gefundene starke Reduzierung der Transkriptmenge gab einen Hinweis auf eine mögliche Mutation innerhalb dieses untersuchten Gens. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde an je 2 unabhängigen DNA-Präparationen beider Mutanten und der Ausgangslinie unter Verwendung der Primer WRKY2 F und WRKY2 R der im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts annotierte genomische Bereich dieses Gens amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Marker	Markertyp	Anzahl rekombinanter Chromosomen in der Kartierungspopulation der Mutante 9/2/5 / der Mutante 12/4/4		Locus	von	bis	Bezeichnung des Gens	Für UGS interessante Annotierung								
ve017	CAPS	3	/	3	⇒	T1J8.1	6669	7515	putative aquaporin (tonoplast intrinsic protein gamma)							
						T1J8.24	12486	11018	expressed protein							
						T1J8.2	14729	13013	expressed protein							
						T1J8.3	27297	16114	putative glucan synthase							
						T1J8.5	35809	34048	xyloglucan endotransglycosylase, putative							
						T1J8.6	42072	40900	putative s-adenosylmethionine synthetase							
						T1J8.4	44855	43346	expressed protein							
						T1J8.7	47000	48424	light-regulated myb protein, putative							
						T1J8.8	53766	52794	Golgi SNARE protein, putative							
						T1J8.9	63341	68229	P-glycoprotein (atpgp1)							
SNP T1J8	SSLP	1	/	1	⇒	T1J8.10	70017	70667	hypothetical protein							
						T1J8.11	72526	71181	expressed protein							
						T1J8.12	73057	72965	unknown protein							
						T1J8.13	76395	77933	putative farnesylated protein							
						T1J8.14	84761	88709	hypothetical protein							
						T1J8.15	90229	91891	putative glucosyltransferase							
						T1J8.16	92340	94217	hypothetical protein							
						T1J8.17	101195	98681	putative RNA polymerase sigma-70 factor	*						
						T1J8.18	101569	102135	unknown protein							
						T1J8.19	104938	106314	putative ABC transporter							
						T1J8.20	107903	109971	transin-like protein							
						T1J8.21	114911	115285	putative auxin-induced protein							
						T1J8.22	121416	118781	phenylalanine ammonia lyase (PAL1)							
						SNP T2N18	SSLP	0	/	0	⇒	T2N18.19	70168	65482	putative receptor-like protein kinase	
												T2N18.18	62623	61435	putative CCAAT-box binding transcription factor	*
												T2N18.17	59973	57834	hypothetical protein	
												T2N18.16	54902	57394	putative myosin heavy chain	
												T2N18.15	49736	51288	unknown protein	
												T2N18.14	47812	46919	hypothetical protein	
												T2N18.13	46270	45233	expressed protein	
												T2N18.12	44144	44709	expressed protein	
												T2N18.11	38955	40734	putative peroxidase ATP2a	
T2N18.10	36096	35630	putative vespiradiene synthase													
T2N18.9	33011	35211	putative protein with C-terminal RING finger	*												
T2N18.8	29912	26351	DMR protein, putative													
T2N18.7	24168	25335	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein 2B)													
T2N18.6	21180	20022	aquaporin (plasma membrane intrinsic protein 2C)													
T2N18.5	18900	19400	60S ribosomal protein L12													
T2N18.4	15915	16861	unknown protein													
T2N18.3	12125	14706	hypothetical protein													
T2N18.2	2628	3979	putative RNA-binding protein													
F3G5.2	8664	6391	unknown protein													
F3G5.3	10934	9449	expressed protein													
F3G5.4	11205	12532	putative adenylate kinase													
F3G5.5	14817	16008	putative WRKY-type DNA binding protein	*												
F3G5.6	18256	17097	40S ribosomal protein S5													
F3G5.7	19614	25631	putative ABC transporter													
F3G5.8	30246	27481	hypothetical protein													
F3G5.9	32445	32059	hypothetical protein													
F3G5.10	36289	34316	hypothetical protein													
F3G5.11	36437	37939	hypothetical protein													
F3G5.12	38404	39386	unknown protein													
F3G5.13	40798	39586	unknown protein													
F3G5.14	41545	41435	unknown protein													
F3G5.15	45036	42769	putative ABC transporter													
F3G5.16	48487	52146	hypothetical protein													
F3G5.17	56042	57007	unknown protein													
F3G5.18	63568	64107	hypothetical protein													
F3G5.19	66580	65579	chloroplast lumen common protein family													
F3G5.20	68064	67333	putative protein translocase													
F3G5.21	69764	74379	putative kinesin heavy chain													
F3G5.22	75668	76204	putative C2H2-type zinc finger protein	*												
F3G5.23	89445	91099	unknown protein													
F3G5.24	94065	92042	nodulin-like protein													
F3G5.25	98223	95880	nodulin-like protein													
F3G5.26	106045	106461	putative histone H2B	*												
F3G5.27	107352	107483	expressed protein													
F3G5.28	107858	108792	unknown protein													
F3G5.29	111902	109117	putative glutamate/ornithine acetyltransferase													
F3G5.30	113717	112325	putative RNA-binding protein													
F3G5.31	118801	114246	unknown protein													
F13M22.2	6647	7499	hypothetical protein													
F13M22.3	9886	7761	putative oxidoreductase													
F13M22.4	13522	11610	putative ADP ribosylation factor 1													
F13M22.5	15634	17182	origin recognition complex protein	*												
F13M22.6	19016	17532	expressed protein													
F13M22.7	20811	21518	expressed protein													
F13M22.8	21930	23788	putative RING zinc finger protein	*												
F13M22.9	25358	26563	putative DOF zinc finger protein													
F13M22.10	31269	30476	60S ribosomal protein L36													
F13M22.11	33739	32935	hypothetical protein													
F13M22.12	36098	37307	actin 3													
F13M22.13	38967	37864	putative MYB family transcription factor													
F13M22.14	45878	44143	putative expansin													
F13M22.15	48689	50845	putative SCARECROW gene regulator													
F13M22.16	53043	51547	expressed protein													
F13M22.17	56602	53450	putative WD-40 repeat protein													
F13M22.18	61581	57887	hypothetical protein													
F13M22.19	62177	66306	putative phosphonobosylaminoimidazole carboxylase													
F13M22.20	70242	66647	CER1-like protein													
F13M22.21	73027	71000	putative receptor-like protein kinase													
F13M22.22	74148	77285	unknown protein													
F13M22.23	80604	78252	putative zinc finger protein													
F13M22.24	84686	83772	putative C2H2-type zinc finger protein													
F13M22.25	87084	87332	expressed protein													
F13M22.26	88062	89809	putative alcohol dehydrogenase													
F13M22.27	90955	92551	putative alcohol dehydrogenase													
T8P21 E	CAPS	1	/	1	⇒	F13M22.19	62177	66306	putative phosphonobosylaminoimidazole carboxylase							
						F13M22.20	70242	66647	CER1-like protein							
						F13M22.21	73027	71000	putative receptor-like protein kinase							
						F13M22.22	74148	77285	unknown protein							
						F13M22.23	80604	78252	putative zinc finger protein							
						F13M22.24	84686	83772	putative C2H2-type zinc finger protein							
						F13M22.25	87084	87332	expressed protein							
						F13M22.26	88062	89809	putative alcohol dehydrogenase							
						F13M22.27	90955	92551	putative alcohol dehydrogenase							

Abb. 17: Übersicht zur Eingrenzung der Mutationsorte der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4. Dargestellt sind die im *Arabidopsis*-Genomprojekt annotierten Loci auf den überlappenden BAC-Klonen T1J8, T2N18, F3G5 und F13M22. Eingezeichnet sind die 6 dem Mutationsort nächsten Marker, die zur Kartierung verwendet wurden sowie die innerhalb der Kartierungspopulationen für diese Marker jeweils gefundene Anzahl rekombinanter Chromosomen. Die auszuschließenden Loci sind grün, die als Mutationort möglichen Loci sind hellrot und der näher untersuchte Locus F3G5.5 ist rot unterlegt.

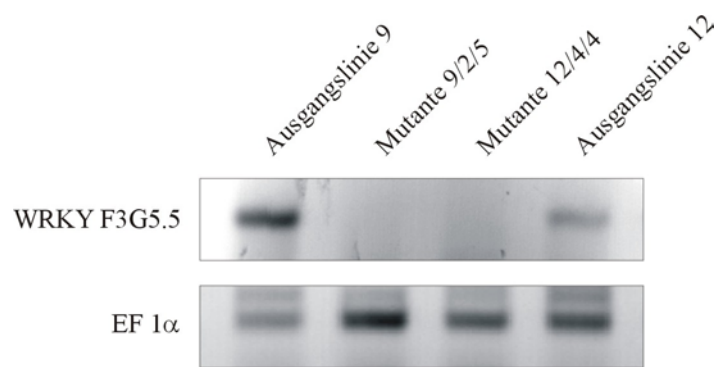


Abb. 3.18: Untersuchungen zur Akkumulation des am Locus F3G5.5 gebildeten Transkripts.

Dargestellt sind RT-PCR-Analysen zur Transkriptakkumulation der am Locus F3G5.5 gebildeten mRNA. Nach der RT-Reaktion und 40 PCR-Zyklen unter Verwendung der genspezifischen Primer WRKYF3G5F und WRKYF3G5R ist bei den Ausgangslinien 9 und 12 das entsprechende Transkriptfragment nachweisbar. Aus der RNA der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 kann kein Transkriptfragment amplifiziert werden. Die Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen erfolgte durch Amplifikation (20 Zyklen) eines Fragments des *Arabidopsis*-Elongationsfaktors 1 α .

Im Ergebnis der Sequenzierung der klonierten Fragmente wurde im kodierenden Bereich des Gens für beide Mutanten jeweils eine unabhängige Punktmutation gefunden, die in beiden Fällen zu einem Translationsstop führt (Abb. 19). Bei beiden Mutanten ist jeweils das für Tryptophan kodierende Triplet TGG zu dem Stoppkodon TGA mutiert.

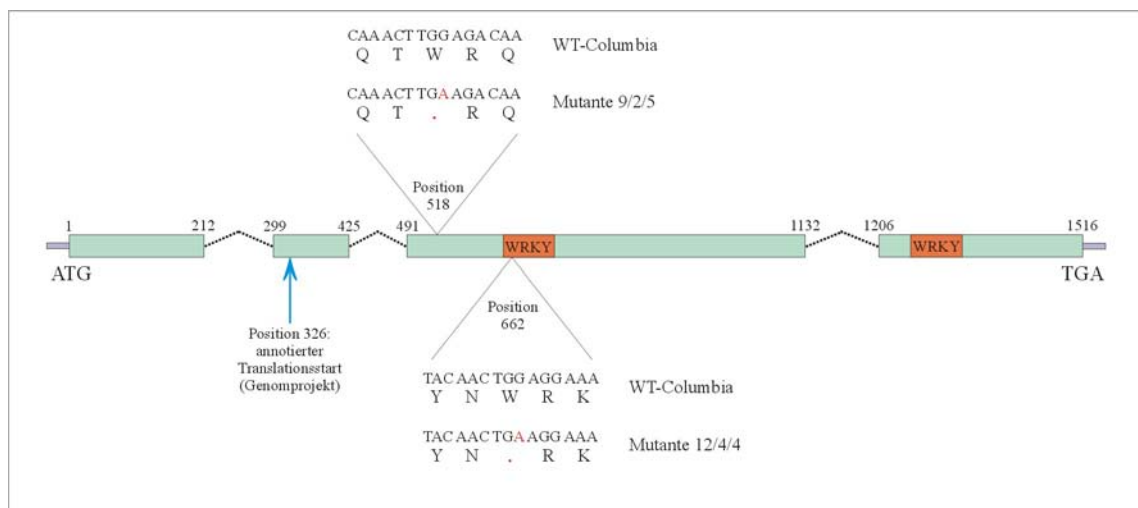


Abb. 19: Ergebnisse der Sequenzanalyse des Locus F3G5.5 in den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4.

Dargestellt ist die Exon-Intron-Struktur des Locus F3G5.5 nach Johnson *et al.* (2002). Das Gen besitzt ein zusätzliches Exon oberhalb des im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts vorhergesagten Translationsstarts. Bei der Analyse der DNA-Sequenz wurde in beiden Mutanten je eine Punktmutation im Locus F3G5.5 identifiziert, die zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führt. In Position 192 bei der Mutante 9/2/5 und in Position 336 bei der Mutante 12/4/4 ist jeweils ein Guanin-Nukleotid zu einem Adenin-Nukleotid mutiert, so daß in beiden Fällen aus dem für Tryptophan kodierenden Triplet TGG das Stoppkodon TGA wurde.

3.6 Komplementationsanalyse der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Zum eindeutigen Nachweis, daß die in dem Locus F3G5.5 gefundenen Punktmutationen die Ursache für den TGS-Suppressorphänotyp und den beobachteten pleiotropen Phänotyp der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 sind, wurden Versuche zur Komplementation der Mutantenphänotypen durchgeführt. Die Komplementation sollte durch transgene Expression eines WT-Allels des Locus F3G5.5 unter Kontrolle eines ca. 1 kb Fragments des endogenen Promotors erfolgen.

In einem weiteren unabhängigen Ansatz sollte durch Kreuzung der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 mit einem dritten, bereits bekannten Mutantenallel des betroffenen Gens gezeigt werden, daß die selektierten Mutanten allel zu der bereits beschriebenen Mutante *ttg2-1* (*transparent testa glabra 2*) (Johnson *et al.* 2002) sind und somit die im Locus F3G5.5 gefundenen Punktmutationen tatsächlich die beobachteten Phänotypen verursachen.

3.6.1 Expression von *TTG2* unter Kontrolle des endogenen Promotors

Zur transgenen Expression von *TTG2* (Locus F3G5.5) wurde in dem binären Vektor pCB302 eine T-DNA konstruiert, die das *TTG2*-Gen unter Kontrolle eines ca. 1 kb großen Fragments des endogenen Promotors und ein CaMV-35S-Poly-A-Signal enthält. Eine Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung dieses T-DNA-Konstrukts befindet sich im Anhang. Mit dieser T-DNA wurden Pflanzen des Wildtyps sowie homozygote Pflanzen der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 Agrobakterien-vermittelt

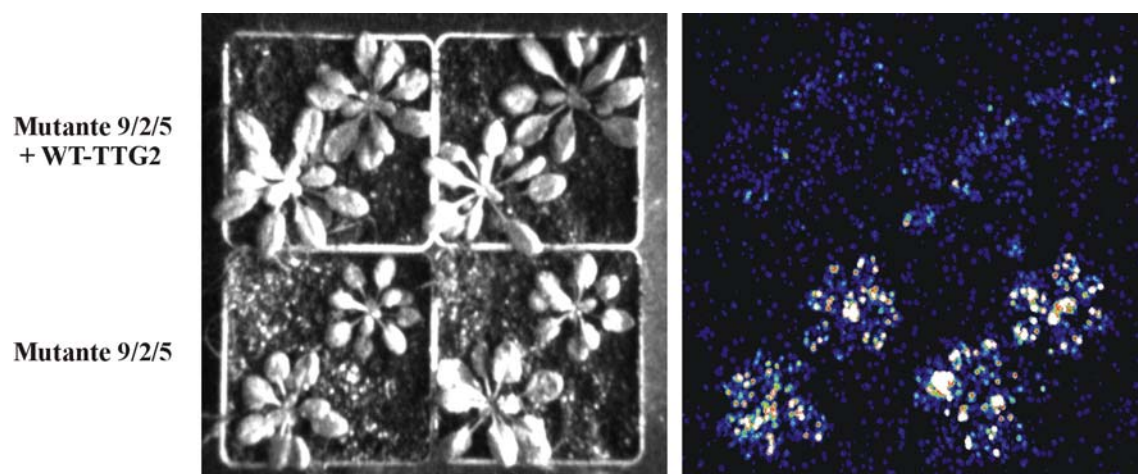


Abb. 20: Komplementation des TGS-Suppressor-Phänotyps bei der Mutante 9/2/5. Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität von selektierten primärtransgenen Pflanzen der mit dem WT-*TTG2*-Konstrukt transformierten Mutante 9/2/5 im Vergleich zu untransformierten Pflanzen der Mutante 9/2/5.

transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die T-DNA-vermittelte Basta-Resistenz. Nahezu bei allen der jeweils ca. 70 selektierten primärtransgenen Pflanzen der Mutantenlinien 9/2/5 und 12/4/4 konnte eine weitgehende Komplementation des TGS-Suppressor-Phänotyps und des Trichom-Phänotyps beobachtet werden. Die nachweisbare Luciferase-Aktivität ist in den transformierten Mutanten deutlich niedriger als in den Ausgangsmutanten (Abb. 20), jedoch nicht so gering wie in den entsprechenden Ausgangslinien der Mutagenese. Der Trichom-Phänotyp der Mutanten (Abb. 21 A) wird durch die Transformation mit der beschriebenen T-DNA vollständig komplementiert (Abb. 21 C). Lediglich bei 8 primärtransgenen Pflanzen konnte nur eine partielle Komplementation festgestellt werden (Abb. 21 B). Diese Pflanzen bilden zwar deutlich mehr Trichome als die Mutanten, jedoch sind diese im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 21 D) meist nicht oder nur einmal verzweigt. Entsprechend ist bei diesen Pflanzen auch keine signifikante Komplementation des TGS-Suppressorphänotyps erkennbar. Keine der ca. 50 untersuchten Nachkommen (T1) der transformierten WT-*Columbia*-Pflanzen zeigte eine auf das transformierte Konstrukt zurückzuführende phänotypische Veränderung.

Die zu diesem Zeitpunkt von Johnson *et al.* (2002) veröffentlichten Ergebnisse über Untersuchungen zu der am Locus F3G5.5 gebildeten mRNA haben gezeigt, daß das *TTG2*-Gen ein zusätzliches Exon oberhalb des im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts vorhergesagten Translationsstarts besitzt (Abb. 19). Diese Erkenntnis hatte jedoch keinen Einfluß auf die durchgeführten Untersuchungen, da für die Komplementationsanalysen ein hinreichend großer genomischer Bereich verwendet wurde.

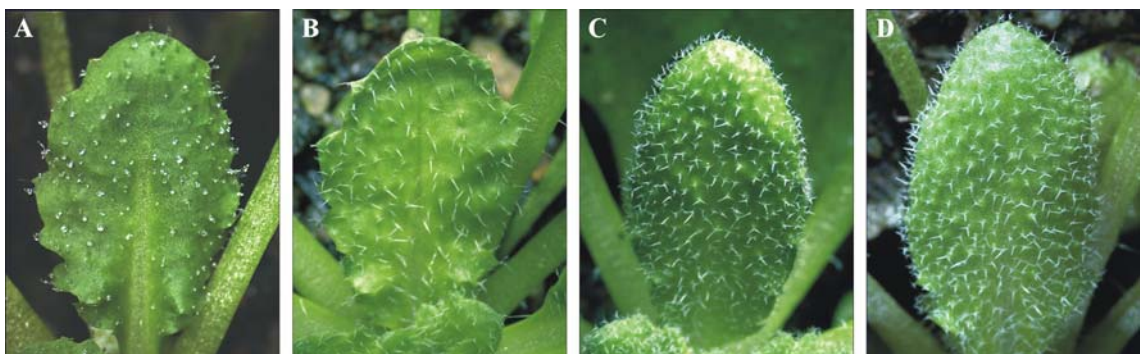
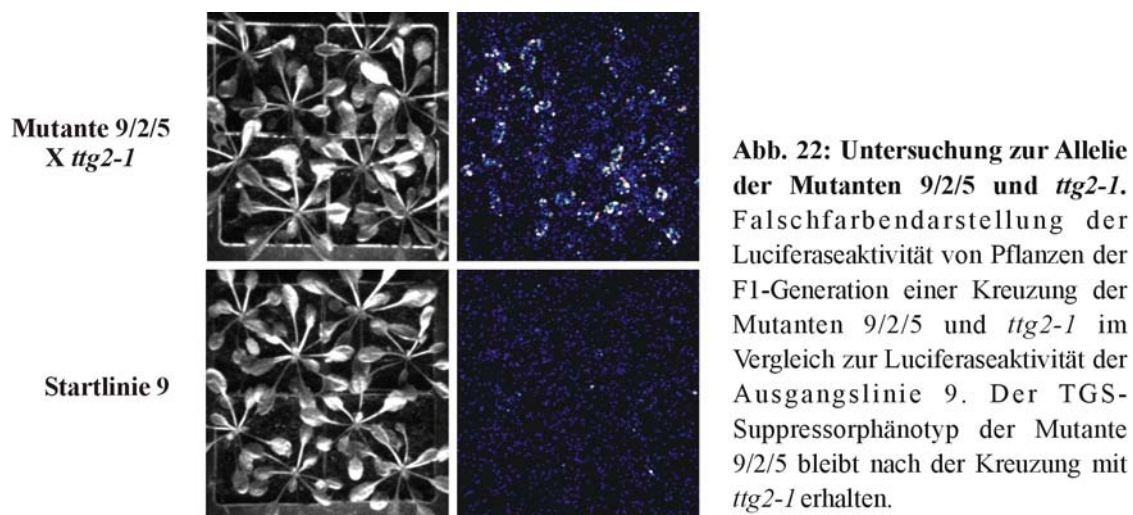


Abb. 21: Komplementation des Trichomphänotyps bei der Mutante 12/4/4.

Die Abbildung zeigt junge Blätter der Mutante 12/4/4 (A), der zur Komplementation mit dem WT-*TTG2*-Konstrukt transformierten Mutante 12/4/4 (B und C) und des Wildtyps *Columbia* (D). Bei einigen primärtransgenen Pflanzen der mit dem WT-*TTG2*-Konstrukt transformierten Mutante wurde nur eine partielle Komplementation des Mutantenphänotyps beobachtet. Die Trichome dieser Pflanzen (B) sind nicht oder nur einmal verzweigt, während die Trichome der meisten transformierten Mutanten (C) vollständig dem WT-Phänotyp (D) entsprechen.

3.6.2 Untersuchung der Allelie der Mutanten 9/2/5, 12/4/4 und *ttg2-1*

Parallel zur Komplementation der Phänotypen durch transgene Expression von *TTG2* wurde durch Einkreuzen des für den Locus F3G5.5 bereits bekannten Mutantenallels *ttg2-1* in die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 bestätigt, daß die gefundenen Mutationen die Ursache der beobachteten Phänotypen sind. Alle Pflanzen der F1-Generation der zwischen den Mutanten durchgeführten Kreuzungen zeigen sowohl den charakteristischen TGS-Suppressor-Phänotyp als auch den beschriebenen Trichomphänotyp. Abbildung 22 zeigt den TGS-Suppressorphänotyp am Beispiel der F1-Pflanzen einer Kreuzung der Mutanten 9/2/5 und *ttg2-1*. Da sowohl der rezessive TGS-Suppressor-Phänotyp als auch der rezessive Trichomphänotyp in der F1-Generation dieser Kreuzung auftritt, müssen die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 allel zu der *ttg2-1*-Mutante sein.



3.7 Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1

Der Mutationsort der Mutante 6/8/1 wurde durch Feinkartierung mittels SSLP-Markern innerhalb einer Kartierungspopulation von 118 Pflanzen auf Chromosom 3 in einem Bereich von ca. 350 kb zwischen den SSLP-Markern NGA162 und ATDMC1 (<http://www.arabidopsis.org/>) eingegrenzt. Mit dem ermittelten Mutationsort, der beobachteten TGS-Suppression und dem charakteristischen pleiotropen Phänotyp (FACIATA-ähnlicher Phänotyp) ergaben sich mehrere Anhaltspunkte, die auf eine Allelie von 6/8/1 mit einer von Z. Tadele und S. Takeda (Friedrich Miescher Institut, Basel) bearbeiteten Mutante hinwiesen. Durch Sequenzierung des betreffenden Locus (At3g18730) konnte von Z. Tadele gezeigt werden, daß die Mutante 6/8/1 allel zu

dieser, in der Arbeitsgruppe von J. Paskowski (Friedrich Miescher Institut, Basel) isolierten TGS-Suppressormutante *bru1-1* (BRUSHY) ist. In der Mutante 6/8/1 wurde im kodierenden Bereich des Gens eine Punktmutation (G zu A) identifiziert, die in Position 214 zu einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin führt.

3.8 Einfluß von *AtSUVH2* auf TGS

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Reuter (Martin-Luther-Universität Halle, Institut für Genetik) wurde das neu identifizierte pflanzliche SET-Domänen-Protein *AtSUVH2* (Locus At2g33290) hinsichtlich seiner Wirkung auf das TGS-System getestet. Dazu wurden F1-Pflanzen von Kreuzungen zwischen den partiell inaktivierten *Silencing*-Linien (LUC 4-Linie 2, GUS 3-Linie 27) und Pflanzen mit transgener Überexpression dieses SET-Domänen-Proteins auf Veränderungen der Reporterexpression untersucht. Die zur Kreuzung verwendeten Pflanzen mit hohem *AtSUVH2*-Expressionslevel zeigen einen charakteristischen Überexpressionsphänotyp. Hemizygot *AtSUVH2*-transgene Pflanzen sind im Vergleich zum Wildtyp kleiner und haben gerollte Kotyledonen sowie durch den Austrieb der Nebenblätter eine deutlich dichtere Blattrosette. Pflanzen, die das Transgen homozygot tragen, sind zwergwüchsig und größtenteils infertil, so daß für die durchgeführten Kreuzungen stets hemizygot Pflanzen verwendet wurden. Im Ergebnis dieser Versuche konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von *AtSUVH2* sowohl in der Luciferaselinie (Abb. 23) als auch in der GUS-Linie (Abb. 24) verstärkend auf TGS wirkt.

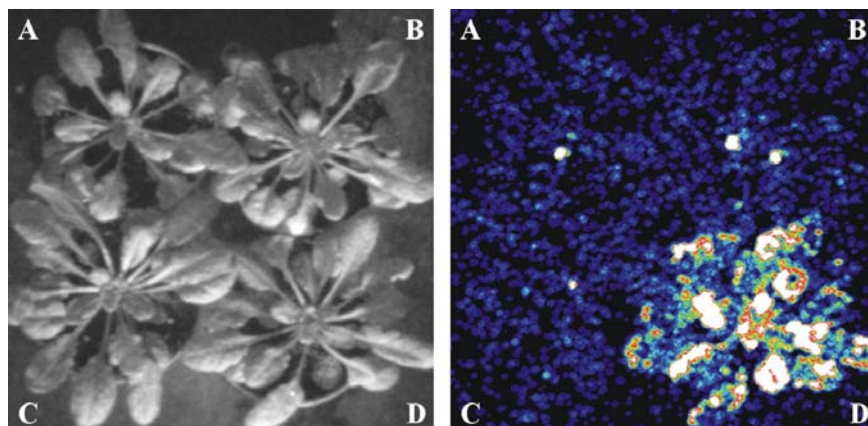


Abb. 23: Verstärkung von TGS durch 35S-*SUVH2* bei der partiell inaktivierten Luciferaselinie. Falschfarbendarstellung der Luciferaseaktivität in Pflanzen der F1-Generation einer Kreuzung der partiell inaktivierten LUC 4-Linie 2 (homozygot) und einer 35S-*SUVH2*-Linie (hemizygot). Durch das parental hemizygot 35S-*SUVH2*-Konstrukt werden in der F1-Generation Pflanzen mit (A, B, C) und ohne *SUVH2*-Transgen (D) erhalten. Bei allen Pflanzen, die das 35S-*SUVH2*-Konstrukt exprimieren, kann deutlich weniger Luciferaseaktivität nachgewiesen werden als in der Kontrolllinie ohne *SUVH2*-Transgen.

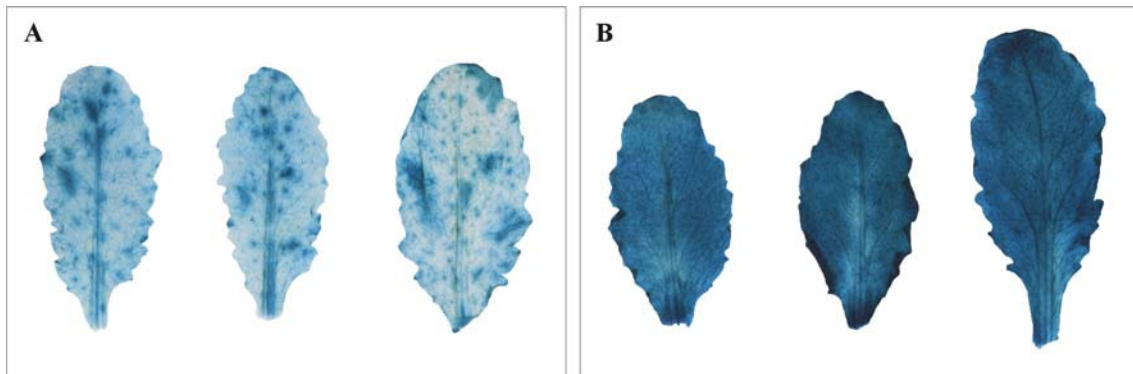


Abb. 24: Verstärkung von TGS durch 35S-*SUVH2* bei der partiell inaktivierten GUS-Linie.

GUS-Aktivitätsfärbung an Blättern von Pflanzen der F1-Generation einer Kreuzung der partiell inaktivierten GUS 3-Linie 27 (homozygot) und einer 35S-*SUVH2*-Linie (hemizygot). Durch das parental hemizygote 35S-*SUVH2*-Konstrukt werden in der F1-Generation Pflanzen mit (A) und ohne (B) *SUVH2*-Transgen erhalten. Bei allen Pflanzen, die das 35S-*SUVH2*-Konstrukt exprimieren, kann deutlich weniger GUS-Aktivität nachgewiesen werden als in den Kontrollpflanzen ohne *SUVH2*-Transgen.

4 Diskussion

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS. Aufgrund des Mangels an einfach handhabbaren und sensitiven Testsystemen für TGS in Pflanzen wurde zunächst ein neues transgenes Testsystem etabliert, das die effiziente Isolation von *Silencing*-Mutanten erlaubt. Die genetische Charakterisierung der erhaltenen *Silencing*-Linien wurde nur in dem Umfang durchgeführt, wie die Ergebnisse von Bedeutung für die Funktionalität des Testsystems bzw. für die Isolation von TGS-Suppressormutanten waren.

4.1 Etablierung eines neuen Testsystems zur genetischen Analyse von TGS

Fast alle der in pflanzlichen Systemen etablierten TGS-Modellsysteme basieren auf der Inaktivierung transgener Antibiotikaresistenzen (Kilby *et al.* 1992, Assaad *et al.* 1993, Ye und Signer 1996, Mittelsten Scheid *et al.* 1998). Entsprechend erfolgt die Selektion von Modifikatoren für TGS unter Anwendung eines *Lethalscreen* mittels Antibiotika auf Pflanzen mit reaktivierter Antibiotikaresistenz. Diese Methode schließt die Isolation von Mutanten mit relativ schwacher bzw. entwicklungs- oder organspezifischer Transgenreaktivierung weitgehend aus. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit drei transgene Reportergene hinsichtlich ihrer Eignung für ein effizient einsetzbares und sensitives TGS-Modellsystem getestet.

Eignung der transgenen Reporter für ein *Silencing*-Testsystem

Die Untersuchungen zur Expression der Reportergene Luciferase, GUS und GFP haben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Handhabbarkeit und Nachweisbarkeit offenbart. Luciferaseaktivität ist ein an *Arabidopsis*-Pflanzen leicht nachweisbarer, gut quantifizierbarer Marker, der sich hervorragend für die Suche nach Mutanten innerhalb einer größeren Pflanzenpopulation eignet. Die durch Verwendung des Restlichtkamarasystems sehr niedrige Nachweisgrenze für die Luciferaseaktivität, verbunden mit der einfachen Auswertung und Dokumentation der Meßergebnisse über Falschfarbenbilder sowie die zerstörungsfreie Messung der Transgenaktivität in der Ganzpflanze war ausschlaggebend für die hauptsächliche Verwendung des Luciferase-Reportergens.

Der große Vorteil des β -Glucuronidase-Transgens gegenüber Luciferase ist die gute Detektierbarkeit der GUS-Aktivität auf zellulärer Ebene, was z.B. die Identifizierung zellklonaler Reaktivierungs- und Inaktivierungsprozesse ermöglicht. Leider hat die invasive Meßmethode zum Nachweis der GUS-Aktivität entweder den totalen Verlust der Pflanze zur Folge oder, wenn nur wenige Pflanzenteile verwendet werden, kann keine Aussage zur Aktivität des Reportergens im Rest der Pflanze getroffen werden. Deshalb wurden die von Dr. Bettina Tschiersch im Rahmen des Gesamtprojekts erzeugten und charakterisierten TGS-Linien mit dem GUS-Transgen nicht für die Mutantenselektion eingesetzt, sondern vor allem zur Untersuchung putativer Modifikatoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf *Silencing*-Prozesse verwendet.

Das GFP-Reportergen ist aufgrund der zu hohen Nachweisgrenze bei Untersuchungen an ganzen Pflanzen nicht für ein sensitives *Silencing*-Testsystem geeignet. Durch Optimierung der Nachweismethode mittels geeigneter optischer Filtersysteme und spezieller UV-Quellen wäre noch eine Erniedrigung der Nachweisgrenze möglich gewesen. Jedoch hätte der dann erforderliche Meßaufwand keine effiziente Analyse großer Populationen, wie z.B. bei einer Mutantenselektion erlaubt.

Architektur der hergestellten T-DNA-Konstrukte

Die Herstellung der T-DNA-Konstrukte mit 2 bis 4 Luciferase-Expressionskassetten in gleicher und inverser Orientierung erfolgte unter Nutzung der Erkenntnisse über RIGS bzw. TGS, wonach i.a. das Vorhandensein und die physische Nähe homologer DNA-Bereiche für die transkriptionelle Inaktivierung ursächlich und erforderlich ist (Assaad *et al.* 1993, Flavell 1994, Matzke und Matzke 1995, Meyer *et al.* 1994, Meyer und Saedler 1996, Mittelsten Scheid *et al.* 1998). Auf der Grundlage von Beobachtungen in *Drosophila*, wo *Inverted Repeats* besonders starker Inaktivierung unterliegen (Dorer und Henikoff 1994), wurden neben direkten Sequenzwiederholungen auch invertierte Sequenzwiederholungen hergestellt. Die Klonierung direkter Sequenzinversionen gelang jedoch in *Escherichia coli* nicht. Durch Paarung der langen invers orientierten sequenzhomologen Bereiche kommt es zur Bildung von Haarnadelstrukturen, die in *Escherichia coli* entweder nicht repliziert oder sehr schnell bei Rekombinationsvorgängen *recA*-unabhängig deletiert werden (Albertini *et al.* 1982, Leach 1994). Befinden sich unikale Sequenzen zwischen den Sequenzinversionen, ist die Häufigkeit *recA*-unabhängiger Rekombinationen in Abhängigkeit vom Abstand der Sequenzwiederholung erheblich reduziert (Bi und Liu 1996). Deshalb wurde zwischen die invertierten sequenzhomologen Bereiche der Selektionsmarker *NPT II* eingefügt.

Luciferaseaktivität der verschiedenen T-DNA-Linien

Bereits bei den ersten Analysen zeigten primärtransgene Pflanzen mit mehreren Luciferase-Expressionskassetten auf der T-DNA fast immer eine deutlich niedrigere Luciferaseaktivität als Pflanzen mit nur einer Expressionskassette. Dies bestätigt die bereits zur Herstellung der Konstrukte berücksichtigten Beobachtungen vieler Autoren (Dorer und Henikoff 1994, Ye and Signer 1996), die TGS stets im Zusammenhang mit dem Auftreten repetitiver DNA-Bereiche beobachtet haben. Auch die in den folgenden Generationen beobachtete z.T. bis zum totalen Verlust der Luciferaseaktivität fortschreitende Inaktivierung korreliert mit den Ergebnissen vergleichbarer Versuche (Kilby *et al.* 1992).

Die Erzeugung der verschiedenen T-DNA-Linien diene vor allem dem Ziel, möglichst stark und über mehrere Generationen stabil inaktivierte Luciferaselinien zu erhalten. Aufgrund der Beobachtung, daß z.B. in *Drosophila* Sequenzinversionen besonders starker Inaktivierung unterliegen (Dorer und Henikoff 1994), wurde erwartet, daß Pflanzen mit den Konstrukten LUC 2 und LUC 5 (*inverted repeats*) die geringste Luciferaseaktivität aufweisen. Jedoch wurde spätestens in der F2-Generation deutlich, daß vor allem Pflanzen, die das Konstrukt LUC 4 (nur *direct repeats*) tragen, besonders starke Transgeninaktivierung zeigen.

Von pflanzlichen Modellsystemen liegen bisher keine Erkenntnisse zum Einfluß direkter bzw. invertierter Sequenzwiederholungen auf die Stärke von TGS vor. Aufgrund der niedrigen Anzahl untersuchter Pflanzen und vor allem mangels ausreichender Kenntnisse über die exakte Architektur der erzeugten T-DNA-Insertionen können allerdings auch aus den hier beobachteten Unterschieden bezüglich der Transgenexpression der verschiedenen Konstrukte keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Transgen-Repeat-Struktur und Grad der Inaktivierung abgeleitet werden. Hierzu wären Untersuchungen zur jeweils entstandenen Struktur der T-DNA-Insertionen bei zahlreichen unabhängigen Insertionsereignissen nötig.

Charakterisierung der T-DNA-Insertionen

Bei Analysen zur Segregation der Luciferase-Transgene wurden in 3 von 6 näher untersuchten Linien mit dem Konstrukt LUC 4 unabhängig segregierende Mehrfachinsertionen der T-DNA nachgewiesen. Bezogen auf primärtransgene Pflanzen mit einer und mehreren unabhängig segregierenden T-DNA-Insertionen sind die gefundenen Verhältnisse vergleichbar mit den Ergebnissen von Segregationsanalysen

anderer Agrobakterien-vermittelter Transformationen von *Arabidopsis thaliana* (Kilby *et al.* 1992).

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Segregationsanalysen lassen die durchgeführten *Southern*-Analysen das Vorhandensein abhängiger Mehrfachinsertionen (Tandeminsertionen) vermuten. Tandeminsertionen und noch komplexere Mehrfachinsertionen sind ein für Agrobakterien-vermittelte Transformationen charakteristisches und häufig beobachtetes Phänomen. Dabei erfolgt vor der Integration in das Genom die Bildung von Konkatemeren aus mehreren T-DNAs (De Neve *et al.* 1997, Krizkova und Hroudá 1998). Sowohl direkte als auch invertierte Wiederholungen der T-DNA treten auf (Jørgensen *et al.* 1987, De Buck *et al.* 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten 6 Linien wurden zuvor wegen ihrer besonders niedrigen Luciferaseexpression aus einer Gesamtzahl von 16 mit dem Konstrukt LUC 4 transformierten Pflanzen selektiert. Möglich ist, daß mit dieser Vorselektion auf niedrige Transgenexpression gleichzeitig eine Selektion auf Tandeminsertionen erfolgte, da nach einem Modell von Dorer und Henikoff (1994) TGS insbesondere dann auftritt, wenn durch Paarung sequenzhomologer Bereiche große und stabile Haarnadel- bzw. Schleifen-Strukturen entstehen können. Eine Tandeminsertion bedeutet sowohl eine Verdopplung der Anzahl von Sequenzwiederholungen an einem Locus, als auch, abhängig von der Orientierung der T-DNAs, die Möglichkeit der Entstehung invertierter Sequenzwiederholungen. Beides wirkt prinzipiell verstärkend auf TGS, da besonders große Bereiche repetitiver Sequenzen entstehen.

Zum Nachweis der Existenz von Tandeminsertionen in den ausgewählten Linien wären Analysen zur exakten Architektur der entstandenen Insertionen erforderlich. Solche Untersuchungen erwiesen sich oft als unmöglich, da iPCR-Experimente und die Klonierung der inserierten T-DNAs aufgrund des hohen Anteils repetitiver Sequenzen nicht erfolgreich waren (De Buck *et al.* 1999). Aus diesem Grund ist auch die Architektur der komplexen T-DNA-Insertionen in den zur Selektion von TGS-Suppressormutanten genutzten *Silencing*-Systemen von Mittelsten Scheid *et al.* (1996) und Davies *et al.* (1997) bislang unbekannt. Erfolgreiche Untersuchungen zur Struktur von Tandeminsertionen wären nur dann möglich, wenn die gekoppelten Insertionen aus zwei in ihrer Sequenz verschiedenen T-DNAs aufgebaut sind (De Buck *et al.* 1999).

Auswahl geeigneter Linien für ein *Silencing*-Testsystem

Für die Suche nach TGS-Suppressormutanten im Rahmen eines EMS-Mutagenese-experiments waren insbesondere extrem stark inaktivierte Linien erforderlich. Deshalb wurde in der Folge, entsprechend den Ergebnissen zur Untersuchung der Luciferaseaktivität, ausschließlich mit Linien gearbeitet, die das Konstrukt LUC 4 mit der höchsten Transgeninaktivierung tragen. Um die Wirkung putativer Modifikatoren für TGS sowohl im Hinblick auf Reduzierung als auch auf Verstärkung der Transgeninaktivierung untersuchen zu können, wurden je eine GUS- und eine Luciferaselinie ausgewählt, die zwar erheblich reduzierte, jedoch bei allen Nachkommen noch gleichmäßig und hinreichend nachweisbare Transgenexpression aufweisen (partiell inaktivierte Linien). Unter der Annahme, daß vor allem die Anordnung der Luciferasegene entscheidend für die transkriptionelle Inaktivierung ist, wurden hierfür Linien gewählt, die das gleiche Konstrukt wie die stark inaktivierten Linien tragen (LUC 4 bzw. GUS 3).

Aufgrund der Anforderungen an die Ausgangslinien hinsichtlich der Stärke der Transgeninaktivierung konnten bei der Entscheidung für die ausgewählten Linien die Ergebnisse der Charakterisierung der T-DNA-Insertionen nicht berücksichtigt werden. Entsprechend sind die gewählten Ausgangslinien durch komplexe T-DNA-Insertionen gekennzeichnet, deren Architektur im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation

In Abhängigkeit der Nachweisbarkeit von *Run-On*-Transkripten des inaktiven Locus wird zwischen transkriptioneller (TGS) und posttranskriptioneller (PTGS) Inaktivierung unterschieden (Dehio und Schell 1994). Durch *Nuclear Run-On*-Transkription an isolierten Zellkernen der inaktivierten Linien konnte nachgewiesen werden, daß die Inaktivierung bei 4 der 5 untersuchten Linien auf transkriptioneller Ebene reguliert ist. Der im Vergleich zu den anderen Linien für die Linie 8 gefundene Unterschied in der Art der Inaktivierung wird durch abweichende Ergebnisse bei weiteren Untersuchungen unterstützt. Die posttranskriptionell inaktivierte Linie 8 unterscheidet sich auch hinsichtlich der nachweisbaren Luciferase-Restaktivität von den anderen 4 Linien dahingehend, daß bei keiner der aus dieser Linie untersuchten Pflanzen Luciferase-Restaktivität, z.B. in den Keimblättern, nachweisbar war. Dies unterstützt das Ergebnis der *Run-On*-Transkription, da die systemische Übertragbarkeit des Signals zur posttranskriptionellen Inaktivierung eine zellklonale Restaktivität des Transgens

ausschließt (Voinnet und Baulcombe 1997, Fagard und Vaucheret 2000). Als ein weiterer Unterschied konnten nach der Mutagenese aus den M2-Nachkommen der Linie 8 im Vergleich zu den anderen Linien wesentlich weniger Pflanzen mit reaktivierter Transgenexpression selektiert werden. Aus welchem Grund die Luciferase-Expressionskassetten der Linie 8 im Gegensatz zu den anderen Linien posttranskriptioneller Inaktivierung unterliegen, ist nicht bekannt. Eine denkbare Erklärung wäre, daß die Summe der Transkripte von mehreren unabhängigen und somit nicht homologieabhängig inaktivierbaren Insertionen den zur Induktion posttranskriptioneller Inaktivierung erforderlichen mRNA-Schwellenwert übersteigt. Eine weitere Möglichkeit ist, daß nach Rekombination innerhalb einer bzw. zwischen mehreren T-DNAs die Bildung von *antisense*-mRNA-Fragmenten erfolgt, was RNAi (*RNA interference*) -vermittelt zur posttranskriptionellen Inaktivierung führt.

In keiner der inaktivierten Linien konnte mittels *Northern*-Analyse Luciferase-mRNA nachgewiesen werden. Jedoch wird in den meisten der TGS-Linien noch *NPT II*-mRNA akkumuliert. Dies verdeutlicht, wie homologieabhängig bzw. sequenzspezifisch die Vorgänge bei der transkriptionellen Inaktivierung repetitiver DNA-Bereiche in Pflanzen ablaufen. Da die *NPT II*-Sequenz auf der T-DNA unikal vorliegt, erfolgt keine homologieabhängige Inaktivierung. Darüber hinaus kann aufgrund dieser Beobachtung ausgeschlossen werden, daß die Inaktivierung der Luciferasegene die Folge eines Positionseffektes ist, der auf die T-DNA wirkt, da in diesem Fall auch keine *NPT II*-mRNA-Transkription stattfinden sollte.

Luciferase-Restaktivität in den TGS-Ausgangslinien

Besonders bei Pflanzen erfordern Umwelteinflüsse und die fortschreitende Entwicklung eine ständige Anpassung der Genexpression an die veränderten Bedingungen. Einige Untersuchungen an genetischen Modellsystemen wie Hefe und *Drosophila* geben Anlaß zu der Vermutung, daß die räumliche und zeitliche Expression zahlreicher Gene in erheblichem Maß über Veränderungen der Chromatinstruktur der entsprechenden DNA-Domänen reguliert wird. Dafür wäre eine ständige Neu- bzw. Umorganisation des Chromatins erforderlich. Daß in Folge solcher Prozesse auch bei TGS entwicklungs- und umweltabhängige Schwankungen der Inaktivierungsstärke auftreten, ist vorstellbar. Voraussetzung zum Nachweis dieser verhältnismäßig geringen Veränderungen ist ein hinreichend sensitives Testsystem, wie es im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Mit Ausnahme der posttranskriptionell inaktivierten Ausgangslinie 8 zeigen viele Pflanzen der anderen Ausgangslinien Luciferase-Restaktivität in den Keimblättern sowie in alten

und absterbenden Blättern. Solche entwicklungspezifischen bzw. alterungsbedingten Schwankungen der Inaktivierungsstärke konnten bei TGS erstmals im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die im Vergleich zu anderen TGS-Modellsystemen wesentlich höhere Sensitivität des neu etablierten Luciferase-*Silencing*-Systems.

Reaktivierung der Transgenexpression bei inaktivierten Linien

Für die Suche nach Suppressormutanten für TGS war die prinzipielle Reaktivierbarkeit der inaktivierten Luciferasegene von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden die beiden zur Reaktivierung inaktivierter Transgene häufig verwendeten Hemmstoffe für chromatinmodifizierende Proteine 5-Aza-Cytidin und Trichostatin A hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Transgenexpression der inaktivierten Linien untersucht. Unter Verwendung des Hemmstoffs 5-Aza-Cytidin konnte gezeigt werden, daß eine beträchtliche Reaktivierung der Luciferaseexpression möglich ist. Nach Einbau in die DNA während der Replikation ist 5-Aza-Cytidin ein kompetitiver Inhibitor (Substratanaloga zu Cytosin-Nukleotiden) für die DNA-Methyltransferase, die die Übertragung von Methylgruppen auf Position 5 des Pyrimidinringes der Cytosinbasen der DNA vermittelt (Santi *et al.* 1983, Jones 1985). Die Reduzierung der Cytosin-Methylierung durch 5-Aza-Cytidin führt in Pflanzen zur Reaktivierung transkriptionell inaktivierter Transgene (Kilby *et al.* 1992, Kumpatla *et al.* 1997). Somit korreliert die beobachtete Reaktivierung der Luciferaseaktivität mit den Daten anderer Autoren.

Trichostatin A wird als spezifischer Inhibitor für die Histondeazetylase verwendet (Yoshida *et al.* 1990). In verschiedenen möglichen Positionen azetylierte Histone sind kennzeichnend für besonders transkriptionell aktive Bereiche des Chromatins (Turner *et al.* 1992, Braunstein *et al.* 1993, Lee *et al.* 1993, Kuo *et al.* 1996). Entsprechend führt die Inhibierung der Histondeazetylase zu einem hyperazetylierten Zustand der Histone in zuvor deazetylierten Chromosomenbereichen, wie z.B. Telomer- und Centromerregionen (Hecht *et al.* 1995). Die daraus resultierende Auflockerung der Chromatinstruktur hat Einfluß auf die Genaktivität transkriptionell inaktivierter Bereiche (Ekwall *et al.* 1997). Diese Ergebnisse wurden vor allem bei Untersuchungen an Hefe und in tierischen Systemen, wie *Drosophila* und Mauszelllinien, erhalten. Über den Effekt der Inhibierung der Histondeazetylase bei Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Chen und Pikaard (1997) konnten in *Brassica*-Hybriden unter Verwendung von Trichostatin A eine Reaktivierung von transkriptionell inaktivierten rRNA-Genen zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder bei niedrigen noch bei sehr hohen

Konzentrationen von Trichostatin A eine Reaktivierung der Luciferaseexpression beobachtet werden. Da die Pflanzen insbesondere bei der hohen Konzentration von 5 µg/ml Trichostatin A mit stark reduziertem Wachstum reagierten, kann eine zu geringe Aufnahme des Inhibitors weitgehend ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für die nicht-Reaktivierbarkeit der Luciferasetranskription könnte sein, daß in Pflanzen die bloße Hyperazetylierung der Histone nicht in jedem Fall ausreichend ist, um eine transkriptionelle Reaktivierung herbeizuführen. Im Gegensatz zu Hefe und tierischen Systemen, bei denen z.B. DNA-Methylierung eine deutlich geringere Rolle spielt, könnten bei Pflanzen zusätzliche Inaktivierungsmechanismen wirken. Ein Hinweis hierauf ist, daß die gleichzeitige Gabe von 5-Aza-Cytidin und Trichostatin A bei Pflanzen keine additive Wirkung zeigte (Chen und Pikaard 1997). Dies bedeutet zum einen, daß Cytosinmethylierung und Histondeazetylierung bei der Inaktivierung innerhalb eines gemeinsamen Reaktionsweges wirken (Chen und Pikaard 1997) und zum anderen, daß ein weiterer von diesen Prozessen unabhängiger Regulationsmechanismus existieren könnte, der eine stärkere Reaktivierung verhindert.

Methylierungsstatus der Luciferasegene in den Ausgangslinien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Methylierungsstatus der Luciferase-Expressionskassetten haben gezeigt, daß die DNA der Luciferasegene in den inaktivierten Linien in hohem Maß methyliert ist. Dies betrifft die beiden analysierten Sequenzmotive CpG und CpNpG in gleicher Weise. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen zahlreicher Autoren, wonach TGS immer mit einer erheblichen Methylierung der DNA des inaktivierten Locus verbunden ist (Meyer *et al.* 1994, Ye und Singer 1996).

Für die Luciferase-Expressionskassetten der partiell inaktivierten Linie 2 konnte gezeigt werden, daß die von Generation zu Generation fortschreitende Transgeninaktivierung mit einer zunehmenden DNA-Methylierung korreliert. Kilby *et al.* (1992) konnten, vergleichbar mit den hier erhaltenen Ergebnissen, in 2 Fällen eine über 4 Generationen fortschreitende Transgeninaktivierung und Hypermethylierung nach Transformation einer T-DNA-kodierten Kanamycinresistenz in *Arabidopsis* beobachten. Auch Hobbs *et al.* (1990) und Linn *et al.* (1990) beschrieben in Tabak bzw. *Petunia* eine in Abhängigkeit der Stärke der Inaktivierung zunehmende DNA-Methylierung des Transgens.

4.2 Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS

Die Reaktivierung bzw. Erhöhung der Luciferaseaktivität diente als Selektionskriterium bei der Isolation der TGS-Suppressormutanten. Als putative Mutanten wurden nur solche Pflanzen selektiert, deren Luciferaseaktivität deutlich höher war als die Restaktivität der anderen, parallel kultivierten M2-Pflanzen. Die gleichzeitige Bearbeitung aller putativen TGS-Suppressormutanten, bei denen Samen erhalten wurde, war aufgrund der großen Anzahl nicht möglich. Deshalb wurden nach wiederholter Analyse eines Teils der isolierten Mutanten in der M3-Generation 19 Mutantenlinien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Als Kriterien für diese Auswahl wurden die Homogenität der Transgenreaktivierung innerhalb der M3-Nachkommen, die Stärke der TGS-Suppression sowie besonders auffällige und dadurch gut reselektierbare pleiotrope Phänotypen berücksichtigt.

Bei der Selektion von Pflanzen mit erhöhter Transgenexpression konnten im Vergleich mit den Ergebnissen eines funktionell analogen Experiments (Mittelsten Scheid *et al.* 1998) erheblich mehr putative Mutanten selektiert werden. Mittelsten Scheid *et al.* (1998) konnten aus 80 000 mit EMS und weiteren 120 000 mit Neutronenstrahlen mutagenisierten M2-Nachkommen nach Reselektion insgesamt 8 Mutanten (*som1 - som8*) isolieren, die eine zuvor inaktivierte repetitive Anordnung von Hygromyзинphosphotransferasegenen reaktivieren. Mindestens 5 dieser Mutanten (*som1, 4, 5, 7* und *8*) wurden als *ddm1*-Allele identifiziert (Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Jeddeloh *et al.* 1999). Obwohl die exakte Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Mutanten aufgrund der nicht abgeschlossenen Reselektion (M3-Generation) nicht feststeht, kann durch Hochrechnung der bisherigen Ergebnisse die Selektion von etwa 30 - 40 durch Reselektion verifizierter Mutanten aus ca. 50 000 untersuchten M2-Nachkommen angenommen werden. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl primär selektierter putativer Mutanten ergibt sich bei Mittelsten Scheid *et al.* (1998) für die EMS-Mutagenese eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf 16 000 M2-Nachkommen. Für die Neutronenstrahlen-Mutagenese ergibt sich eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf 5 700 M2-Nachkommen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutantenselektion ergibt sich eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf ca. 300 M2-Nachkommen. Ein Vergleich der so ermittelten Mutationsfrequenzen ist nur unter der Annahme etwa gleicher Mutagenesebedingungen möglich. Dies verdeutlicht allein der von Mittelsten Scheid *et al.* gefundene Unterschied zwischen EMS- und Neutronenstrahlen-

Mutagenese. Da jedoch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Mutationsfrequenz im Vergleich mit den Ergebnissen von Mittelsten Scheid *et al.* zwischen 20 und 50 mal höher ist, kann ein Unterschied in der Stärke der Mutagenese als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Vielmehr bestätigt das Ergebnis die dieser Arbeit zugrundeliegende Vermutung, daß durch Etablierung eines sensitiveren Testsystems für TGS die Isolation einer wesentlich höheren Anzahl putativer Modifikatoren für TGS möglich ist. Jedoch wurden von fast 40 % der primär isolierten Mutanten (M2-Generation), meist aufgrund mangelnder Fertilität der Pflanzen, keine Samen erhalten. Für den Fall einer Wiederholung der Mutantenselektion zur Isolation weiterer TGS-Suppressormutanten wäre zur Erhaltung dieser infertilen Mutanten die sofortige Kreuzung mit Wildtyppflanzen erforderlich. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutantenselektion wurden aufgrund der hohen Anzahl putativer Mutanten keine Kreuzungen zur Erhaltung der infertilen Pflanzen realisiert.

Transgenexpression in den isolierten Mutanten

Der überwiegende Teil struktureller und regulatorischer Chromatinkomponenten sollte aufgrund ihrer Erforderlichkeit für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Chromatins in allen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert sein. Demzufolge ist bei TGS-Suppressormutanten, die solche Chromatinkomponenten betreffen, i.a. eine konstitutive Reaktivierung der Luciferaseaktivität zu erwarten. Entsprechend wurde auch bei den meisten der näher untersuchten Mutanten kein spezifisches Reaktivierungsmuster festgestellt. Eine Ausnahme bilden die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4, die eine spezifische Luciferase-Reaktivierung in Trichomen und entlang der Blattränder aufweisen. Im Hintergrund der partiell inaktivierten GUS-Linie ist der TGS-Suppressor-Phänotyp auf die abnormal ausgebildeten Trichome beschränkt. Mit den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurden erstmals TGS-Suppressormutanten identifiziert, die eine gewebespezifische Transgenreaktivierung aufweisen. Die Produkte der von den bisher bekannten *Silencing* suppressierenden Mutationen betroffenen Gene sind entsprechend ihrer generellen Erforderlichkeit bei der Ausbildung einer korrekten Chromatinstruktur in allen Geweben konstitutiv exprimiert.

Methylierungsstatus der Luciferasegene in den isolierten Mutanten

Die Analysen zum Methylierungsstatus haben bei etwa 50 % der isolierten TGS-Suppressormutanten eine z.T. drastische Reduzierung der DNA-Methylierung der Luciferase-Expressionkassetten offenbart. Nach einem Modell von Amedeo *et al.*

(2000) können in Pflanzen TGS-modifizierende Mutanten in 2 Klassen unterschieden werden: Mutanten mit Veränderung der DNA-Methylierung, wie die bekannten TGS-Suppressormutanten *ddm1* (Vongs *et al.* 1993), *cmt3* (Lindroth *et al.* 2001) und *kyp* (Jackson *et al.* 2002) sowie TGS-Suppressormutanten ohne Veränderung der DNA-Methylierung, wie *mom* (Amedeo *et al.* 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten bestätigen dieses Modell, wonach bei TGS methylierungsabhängige und unabhängige Prozesse wirken. Ob TGS-Mutanten ohne veränderte Methylierung Komponenten eines Reaktionsweges sind, der bei der Inaktivierung nach der DNA-Methylierung (*downstream*) wirkt oder vollständig unabhängig funktionieren, ist bisher ungeklärt.

Die bereits bekannten TGS-Suppressormutanten mit veränderter DNA-Methylierung sind in den meisten Fällen durch eine für das jeweils mutierte Gen charakteristische motifspezifische Veränderung der DNA-Methylierung gekennzeichnet. Dadurch ist es möglich, bei neu isolierten Mutanten mit Hilfe von Untersuchungen zum DNA-Methylierungsstatus, erste Hinweise bezüglich des eventuell betroffenen Gens zu erhalten. Bei der Mutante 7/2/11 wurde eine drastische DNA-Hypomethylierung im Motiv CpNpG festgestellt, während die Methylierung im Motiv CpG unverändert bleibt. Diese drastische, auf das Motiv CpNpG beschränkte Reduzierung der DNA-Methylierung ist charakteristisch für *CMT3*-Mutanten. Da der für die Mutante 7/2/11 bei der Kartierung ermittelte wahrscheinliche Mutationsort zudem im Bereich des *CMT3*-Locus liegt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß 7/2/11 ein *CMT3*-Allel darstellt. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) im *CMT3*-Locus der Mutante 7/2/11 eine Punktmutation nachweisen, die zu einem Aminosäureaustausch in der Methyltransferase-Domäne des *CMT3*-Gens führt.

Pleiotrope Phänotypen der TGS-Suppressormutanten

Im Vergleich mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp *Columbia* sind 14 der 19 ausgewählten Mutanten in der M3-Generation durch deutliche morphologische Unterschiede gekennzeichnet. Für 6 dieser Mutanten konnte gezeigt werden, daß die gefundenen morphologischen Phänotypen nicht die Folge weiterer eigenständiger Mutationen, sondern pleiotrope Effekte der TGS-supprimierenden Mutationen sind (s. Tab. 5). Unter der Annahme, daß viele der isolierten Mutationen strukturelle oder regulatorische Komponenten des Chromatins betreffen, ist eine mögliche Erklärung für das häufige Auftreten pleiotroper Phänotypen, daß die mit dem TGS-Suppressor-Phänotyp

verbundenen Veränderungen bei der Regulation der Chromatinstruktur oft auch zur Fehlregulation bei der Expression weiterer endogener Gene führen. In Folge der TGS-Suppression können z.B. die Transkriptmengen wichtiger homeotischer Gene verändert sein oder zuvor durch TGS transkriptionell inaktivierte Bereiche des Genoms exprimiert werden (Steimer *et al.* 2000). Ein bereits bekanntes und besonders eindrucksvolles Beispiel hierfür sind die zahlreichen unterschiedlichen, nicht mendelnden pleiotropen Phänotypen bzw. morphologischen Veränderungen bei *MET1*-Mutanten, die durch veränderte Genexpression als Folge von DNA-Hypomethylierung bzw. partieller Hypermethylierung zuvor unmethylierter Loci entstehen (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996). Einige dieser Phänotypen sind die Folge epigenetischer Veränderungen (Epi-Mutanten) des *Arabidopsis*-*SUPERMAN* (*SUP*)-Locus, die u.a. durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet sind und als *Clark Kent*-Mutanten bezeichnet werden (Jacobson und Meyerowitz 1997). Der Phänotyp ist erblich, jedoch nicht dauerhaft stabil, so daß bei Segregationsanalysen kein mendelnder Erbgang gefunden wird. Die ähnlichen, jedoch verschieden stark ausgeprägten pleiotropen Phänotypen der Mutanten 7/2/7, 7/4/4 und 12/1/1 sind vergleichbar mit den für *Clark Kent*-Mutanten charakteristischen morphologischen Veränderungen. Zudem wurde in den Kartierungspopulationen dieser Mutanten eine nicht den Mendelschen Gesetzen folgende Vererbung dieser morphologischen Phänotypen gefunden. Diese Beobachtungen legen im Zusammenhang mit den identifizierten Mutationsorten und der zumindest bei den Mutanten 7/2/7 und 7/4/4 festgestellten DNA-Hypomethylierung die Vermutung nahe, daß die Mutanten 7/2/7, 7/4/4 und 12/1/1 *MET1*-Allele darstellen. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) im *MET1*-Locus dieser drei Mutanten jeweils eine Punktmutation nachweisen, die zu einem vorzeitigen Translationsstoppsignal bzw. zu einem Aminosäureaustausch führt.

4.3 Kartierung der Mutationsorte der isolierten Mutanten

Mit 15 der 19 ausgewählten Mutanten wurden Versuche zur Kartierung der mutierten Loci durchgeführt. Im Ergebnis dieser Grobkartierung nach Selektion einer Kartierungspopulation über den TGS-Suppressor-Phänotyp wurde für diese Mutanten jeweils ein wahrscheinlicher Mutationsort lokalisiert. Dadurch war die Überprüfung der Mutanten auf mögliche Allelien untereinander und zu bereits bekannten TGS-

Suppressormutanten möglich. Alternativ hätte die Testung auf Allelie durch Komplementationsanalysen nach Kreuzung der Mutanten wegen der bei einigen Linien z.T. erheblich reduzierten Fertilität Probleme bereitet. Aufgrund der verschiedenen ermittelten Mutationsorte kann u.a. eine Allelie der phänotypisch ähnlichen und aus einem Pool selektierten Mutanten 12/1/1, 12/1/3 und 12/1/7 ausgeschlossen werden. Im Fall der später als allel identifizierten Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurde dagegen bereits bei der Grobkartierung eine weitgehende Übereinstimmung der Mutationsorte gefunden.

Für die Mutanten 9/2/1 und 9/2/6, die aus einem Pool selektiert wurden, identische Phänotypen zeigen und am gleichen Locus kartieren, wird angenommen, daß beide Mutanten die Nachkommen einer M1-Pflanze sind. Obwohl diese wie auch die Mutanten 6/1/2 und 12/2/7 nicht die für einige *DDMI*-Mutanten charakteristischen pleiotropen Phänotypen zeigen (Finnegan *et al.* 1996), lassen die reduzierte DNA-Methylierung und die physische Nähe der identifizierten Mutationsorte zum *DDMI*-Locus vermuten, daß diese vier Mutanten *DDMI*-Allele sind. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität Halle, Institut für Genetik) durch Sequenzierung des *DDMI*-Locus in den Mutanten 6/1/2, 9/2/1 und 12/2/7 Punktmutation nachweisen, die direkt bzw. in Folge mutierter Exon-Intron-Übergänge zu einem vorzeitigen Translationsstoppsignal führen. Aufgrund der als wahrscheinliche Mutationsorte identifizierten Loci (s. Abb. 3.16), ist davon auszugehen, daß die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter bearbeiteten putativen Mutanten 6/4/1, 12/1/3 und 12/1/7 nicht zu einer der bisher bekannten TGS-Suppressormutanten (*mom*, *cmt3*, *ago4*, *drm1*, *drm2*, *kyp*, *met1* und *ddm1*) allel sind.

4.4 Untersuchungen an den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Der Mutationsort der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 liegt im Locus F3G5.5

Die Analysen zur Segregation der pleiotropen Phänotypen, die Kartierungsdaten und der charakteristische TGS-Suppressor-Phänotyp gaben deutliche Hinweise, daß 9/2/5 und 12/4/4 allele Mutanten sind. Nach Eingrenzung des Mutationsortes der Mutanten erfolgte die Identifizierung des mutierten Gens durch vergleichende RT-PCR-Analysen zur Akkumulation von mRNA an dem aufgrund der Position und der Annotierungsdaten als Mutationsort wahrscheinlichsten Locus F3G5.5. Diese Vorgehensweise beruht auf der Erkenntnis, daß in eukaryotischen Organismen mRNA mit einem durch eine *Frame-*

Shift-Mutation oder ein Nonsense-Kodon bedingten vorzeitigem Translationsstopkodon im Vergleich zur WT-mRNA oft wesentlich schneller abgebaut wird. Durch diesen *Nonsense-Mediated Decay* (NMD) genannten Prozeß wird die Entstehung von verkürzten und somit nicht funktionellen Proteinen verhindert. Umfangreiche Kenntnisse zu NMD existieren vor allem bei Hefe und Säugerzellen (Maquat 1995, Culbertson 1999, Hentze und Kulozik 1999). Domeier *et al.* (2000) konnten an NMD-defekten Mutanten von *Caenorhabditis elegans* zeigen, daß eine funktionelle Kopplung zwischen NMD und dem schnellen RNA-Abbau bei RNAi (*RNA interference*) besteht. Über NMD in Pflanzen ist relativ wenig bekannt, jedoch wurde bei der Untersuchung von Mutanten u.a. in Reis (Isshiki *et al.* 2001), Bohne (Jofuku *et al.* 1989) und Erbse (Dickey *et al.* 1994) ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Menge des mutierten Locus gefunden. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte bei den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 eine erhebliche Reduktion der mRNA des mutierten Locus F3G5.5 im Vergleich zum WT-Allel festgestellt werden. In beiden Mutanten wurde in diesem Locus jeweils ein vorzeitiges Translationsstoppsignal gefunden, das den beobachteten NMD auslöst. Das Translationsstoppsignal TGA ist in beiden Fällen durch Mutation eines Guanin-Nukleotids zu einem Adenin-Nukleotid in dem für Tryptophan kodierenden Triplet TGG entstanden. Diese Art von Punktmutationen ist charakteristisch für eine chemische Mutagenese mit EMS, bei der vorwiegend die Purin-Nukleobasen Adenin oder Guanin entsprechend in die jeweils andere Nukleobase umgewandelt wird.

Die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 sind Mutanten in *TTG2*

Der in den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 mutierte Locus F3G5.5 wurde im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts als putatives WRKY-Typ DNA-bindendes Protein annotiert (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000) (<http://www.arabidopsis.org>). Eine Literaturrecherche über WRKY-Proteine im Anschluß an die Identifizierung der Mutationen in 9/2/5 und 12/4/4 hat ergeben, daß für den Locus F3G5.5 bereits eine Mutante mit dem charakteristischen Trichomphänotyp isoliert wurde (Eulgem *et al.* 2000), über die jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keine veröffentlichten Informationen vorlagen. Dennoch stellte David Smyth (*Monash University*, Victoria, Australien) auf Anfrage freundlicherweise Saatgut dieser in seinem Labor selektierten Mutante für Komplementationsanalysen zur Verfügung. Diese nach Mutagenese mit dem *Arabidopsis*-endogenen *Tag1*- Transposon (Tsay *et al.* 1993) aufgrund des sichtbaren Trichom-Phänotyps selektierte Mutante wurde als *ttg2-1* (*transparent testa glabra 2-1*) und ein zweites selektiertes Allel als *ttg2-2* bezeichnet (Johnson *et al.* 2002).

***TTG2* kodiert für ein DNA-bindendes Protein vom WRKY-Typ**

WRKY-Proteine bilden eine pflanzenspezifische Superfamilie von Transkriptionsregulatoren mit allein 72 Mitgliedern in *Arabidopsis*, die aufgrund struktureller Unterschiede in 3 Gruppen eingeteilt wurden (Riechmann *et al.* 2000, Eulgem *et al.* 2000). Außerhalb der je nach Subtyp ein bis zwei WRKY-Domänen, einer ca. 60 Aminosäuren umfassenden Region, die bei allen Mitgliedern der WRKY-Familie hochkonserviert ist, zeigen die einzelnen Mitglieder eine hohe strukturelle Divergenz. Jede WRKY-Domäne ist über das N-terminale Aminosäure-Sequenzmotiv WRKYGQK definiert, das eine sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt (Eulgem *et al.* 1999). Entsprechend wurden viele WRKY-Proteine aufgrund ihrer Fähigkeit zur spezifischen Bindung an das DNA-Motiv (T)(T)TGAC(C/T) identifiziert (Rushton *et al.* 1995 und 1996), das als W-Box bezeichnet wird. W-Box-Elemente finden sich in der Promotorregion zahlreicher Gene, besonders häufig jedoch bei Abwehrgenen (Rushton und Somssich 1998). Da zudem u.a. in Tabak für einige WRKYs eine Transkriptakkumulation nach Pathogenkontakt beobachtet wurde, ist anzunehmen, daß zumindest einige dieser Proteine als Transkriptionsfaktoren in die Pathogenabwehr involviert sind (Chen und Chen 2000).

Die Mutante *ttg2-1* ist der bisher einzige beschriebene Vertreter von WRKY-Mutanten mit einem morphologischen Phänotyp (Johnson *et al.* 2002). BLAST-Analysen (Altschul *et al.* 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) haben gezeigt, daß *TTG2* zu dem aus Tabak klonierten DNA-bindenden Protein *WRKY2* (Wang *et al.* 1998) (Locus AAD16139.1) die größte Homologie aufweist (45 % Identität der Aminosäuresequenz über einen Bereich von 267 Aminosäuren). Die Homologie beschränkt sich jedoch im wesentlichen auf die konservierten Bereiche der WRKY-Domänen, während andere Sequenzbereiche relativ stark divergieren. *NiWRKY2* wurde aufgrund seiner bei der hypersensitiven Reaktion resistenter Tabakpflanzen nach Infektion mit TMV (*tobacco mosaic virus*) beobachteten sequenzspezifischen DNA-Bindung an das W-Box-Motiv identifiziert (Wang *et al.* 1998). Ähnlich diesem Gen werden viele der bisher untersuchten WRKYs, nach Kontakt der Pflanze mit einem Pathogen, Salicylsäure, Jasmonat, Ethylen oder mechanischer Verwundung transkriptionell aktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *TTG2* unabhängig von Umwelteinflüssen und Wachstumsbedingungen, die auf die Pflanzen wirken (Johnson *et al.* 2002).

Das Expressionsmuster von TTG2 korreliert mit dem Muster der TGS-Suppression

TTG2 ist durch ein spezifisches Expressionsmuster in der Pflanze gekennzeichnet. Johnson *et al.* (2002) konnten mittels *in situ*-Hybridisierung und durch transgene Expression des GUS-Reportergens unter Kontrolle eines 1 kb endogenen *TTG2*-Promotorfragments nachweisen, daß der *TTG2*-Promotor eine sehr spezifische Expression in sich entwickelnden Samenhüllen, in Wurzelspitzen und in allen Entwicklungsstufen der Trichome vermittelt. Ein für die Expression in Wurzelspitzen verantwortliches Promotorelement wurde im Bereich zwischen 700 und 1000 bp oberhalb des Translationsstarts identifiziert. Für die Expression in Trichomen und den Wurzelspitzen verantwortliche Elemente sind zwischen 300 und 700 bp oberhalb des Translationsstarts lokalisiert (Johnson *et al.* 2002). Das spezifische Expressionsmuster lässt auf eine Funktion von TTG2 bei morphologischen Entwicklungsprozessen vor allem in den Zellen schließen, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickeln. Jedoch wird *TTG2* nicht direkt in meristematischen Zellen der L1-Schicht exprimiert (Johnson *et al.* 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten *TTG2*-Mutanten zeigen vor allem in den Trichomen und den äußeren Bereichen junger Blätter eine spezifische Reaktivierung der Luciferaseaktivität. Ein identisches Reaktivierungsmuster konnte bei der für die Komplementationsanalysen verwendeten Mutante *ttg2-1* beobachtet werden. Neben der Expression in Trichomen konnten Johnson *et al.* (2002) insbesondere auch in sehr jungen Blättern eine signifikante Aktivität des *TTG2*-Promotors nachweisen. Somit korreliert das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete charakteristische Muster der TGS-Suppression in *TTG2*-Mutanten mit der von Johnson *et al.* (2002) gefundenen spezifischen Expression des *TTG2*-Gens.

Untersuchungen an periklinalchimären Pflanzen haben gezeigt, daß bei Blättern neben der Epidermis auch die äußeren Bereiche des Mesophylls der meristematischen L1-Schicht entstammen. Demnach ist die in den Blatträndern der Mutanten gefundene Reaktivierung der Luciferaseaktivität ebenfalls mit dem Verlust der Expression von *TTG2* in Zellen erklärbar, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickelt haben.

Die transgene Expression von TTG2 komplementiert die Phänotypen der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Der TGS-Suppressor-Phänotyp und der pleiotrope Trichom-Phänotyp der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurden durch transgene Expression des WT-Allels unter Kontrolle eines 1 kb endogenen Promotorfragments komplementiert. Aufgrund der durch den *TTG2*-Promotor vermittelten spezifischen Expression ist anzunehmen, daß zur vollständigen Komplementation aller Phänotypen der *TTG2*-Mutanten diese exakt lokalisierte Expression des *TTG2*-Genprodukts unbedingt erforderlich ist. Zur Untersuchung der Bedeutung der spezifischen Promotoraktivität für die Funktion von *TTG2* bei der Trichombildung und der Etablierung von TGS wären Analysen an Pflanzen mit konstitutiv und induzierbar exprimiertem *TTG2* eventuell hilfreich. Johnson *et al.* (2002) konnten durch Analysen an den Trichommutanten *gl1* (*glabra 1*), *gl2* (*glabra 2*) und *ttg1* (*transparent testa glabra 1*) sowie an Doppelmutanten (*gl1-ttg2*, *gl2-ttg2* und *ttg1-ttg2*) weder eine gegenseitige Beeinflussung der Expression noch eine funktionelle Kopplung zwischen *TTG2* und den bei diesen Mutanten betroffenen Genprodukten nachweisen. Eventuell besteht jedoch eine zumindest teilweise funktionelle Redundanz zwischen *GL2* und *TTG2*, die auch ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen (Johnson *et al.* 2002). Aus diesem Grund wären auch Untersuchungen zur Wirkung von *gl2*-Mutanten auf TGS sinnvoll.

Ein weiterer, für die Trichommutanten *ttg1* und *ttg2* charakteristischer Phänotyp ist das Fehlen der dunkelbraunen Färbung der Samenhülle. Im Wildtyp beruht die Färbung der Samenschale auf der Oxidation farbloser Tannin-Vorstufen zu Tannin während der Reifung der Samen. In den Mutanten erfolgt keine Akkumulation der Tannin-Vorstufen, da *TTG1* für die Expression von *BAN* (*BANYULS*) erforderlich ist, einem Gen, das den ersten Schritt der Tannin-Biosynthese kontrolliert (Nesi *et al.* 2000). Erste Untersuchungen lassen vermuten, daß wahrscheinlich auch *TTG2* als Transkriptionsfaktor direkt die Expression von *BAN* und eventuell weiterer Gene der Tannin-Biosynthese kontrolliert (Johnson *et al.* 2002).

4.5 Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1

Phänotypische und genetische Gemeinsamkeiten wiesen auf eine Allelie der Mutanten 6/8/1 und *bru1-1* (*BRUSHY*) hin. Das Allel *bru1-1* wurde mittels T-DNA-Mutagenese erzeugt und auf der Suche nach Mutanten mit erhöhter Sensitivität gegenüber dem

DNA-schädigenden Stoff MMS (Methylmethansulfonat) isoliert (Takeda *et al.* 2004). Bei der näheren Charakterisierung dieser Mutante wurde ein relativ schwacher TGS-Suppressoreffekt beobachtet, der nicht mit einer Veränderung der DNA-Methylierung verbunden ist. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der Charakterisierung der Mutante 6/8/1. Durch Sequenzanalysen an genomischer DNA der Mutante 6/8/1 wurde im kodierenden Bereich des *BRUI*-Gens eine Punktmutation identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin führt. Entsprechend wurde die Mutante 6/8/1 als Allel *bru1-2* bezeichnet (Takeda *et al.* 2004). Damit ist *bru1* nach *mom* und der im Rahmen dieser Arbeit als TGS-Suppressoren identifizierten *ttg2*-Allele eine weitere *Silencing*-supprimierende Mutante, bei der keine Veränderung der DNA-Methylierung beobachtet wird.

BRUI kodiert für ein offenes Leseraster von 1311 Aminosäuren. Das abgeleitete Protein zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen mit bekannter Funktion. Die Aminosäuresequenz von BRU1 enthält Tetratricopeptid-*Repeats* (TPRs) (Blatch und Lässle 1999) und leucinreiche *Repeats* (LRRs) (Kobe und Deisenhofer 1994), zwei konservierte Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Weiterhin werden für BRU1 *coiled-coil*-Regionen, ein Kernlokalisierungssignal und ein Leucin-*Zipper*-Motiv vorhergesagt, das potentiell mit DNA interagieren kann (Takeda *et al.* 2004).

Der im Mutantenallel *bru1-2* (Mutante 6/8/1) gefundene Aminosäureaustausch ist in der N-terminalen TPR-Region lokalisiert. Durch die Mutation erfolgt ein Austausch der für die Entstehung der antiparallel-helikalen TPR-Struktur essentiellen Aminosäure Glycin in Position 27 des 34 Aminosäuren langen TPR-Motifs (Takeda *et al.* 2004).

4.6 Der Einfluß von *AtSUVH2* auf TGS

Mutationen im *Drosophila*-Heterochromatinprotein SU(VAR)3-9 wirken als starker *Haplo*-Suppressor und *Triplo-Enhancer* auf Positioneffektvariegation (Tschiersch *et al.* 1994). SU(VAR)3-9 gehört zur Familie der SET-Domänen-Proteine und ist eine Histon H3 Lysin 9 (H3K9) -Methyltransferase (Rea *et al.* 2000). In *Arabidopsis* wurden bisher 10 Gene für SU(VAR)3-9-homologe SET-Domänen-Proteine identifiziert (Baumbusch *et al.* 2001). Eines dieser Gene, das ebenfalls für eine H3K9-Methyltransferase kodiert, ist *KYP* (KRYPTONITE) bzw. *SUVH4* (Jackson *et al.* 2002). Mutanten in *KYP* zeigen einen TGS-Suppressor-Phänotyp und reduzierte DNA-

Methylierung im Motiv CpNpG, da in Folge der fehlenden H3K9-Methylierung die spezifische Bindung von Chromomethylase 3 (CMT3) an das Chromatin unterbleibt. Ein weiteres, in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Reuter (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) bearbeitetes pflanzliches SET-Domänen-Protein mit signifikanter Homologie zu SU(VAR)3-9 ist AtSUVH2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, daß die transgene Überexpression von SUVH2 sowohl in der partiell inaktivierten Luciferaselinie als auch in der partiell inaktivierten GUS-Linie verstärkend auf TGS wirkt. In Fortführung dieser Arbeiten konnte von K. Naumann (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) unter Verwendung der partiell inaktivierten Luciferaselinie gezeigt werden, daß in *SUVH2-antisence*-Linien TGS signifikant supprimiert ist. Somit konnte festgestellt werden, daß in *Arabidopsis* neben *KYP* mindestens ein weiteres *Drosophila* *SU(VAR)3-9*-homologes Gen an der Regulation von TGS beteiligt ist. Bisher wurde für SUVH2 keine enzymatische Aktivität nachgewiesen, so daß ungeklärt ist, über welchen Mechanismus SUVH2 TGS beeinflusst. Jedoch ist aufgrund der starken strukturellen Homologie zu SU(VAR)3-9 und KYP die Vermutung naheliegend, daß auch SUVH2 eine Histon-Methyltransferase darstellt, die sich möglicherweise durch eine andere Substratspezifität von KYP unterscheidet. Springer *et al.* (2003) postulieren für SUVH2 aufgrund seiner strukturellen Homologie zu SU(VAR)3-9, KYP und weiteren SET-Domänen-Proteinen eine H3K9-Methyltransferase-Aktivität.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* (TGS). Aufgrund des Mangels an einfach handhabbaren und sensitiven Testsystemen für TGS in Pflanzen wurde in *Arabidopsis thaliana* zunächst ein neues *Silencing*-Testsystem auf der Basis transkriptionell inaktivierter transgener Reportergene (GUS, Luciferase) etabliert. Dazu wurden *Arabidopsis*-T-DNA-Linien hergestellt, die auf einer T-DNA ein bis vier Kopien eines der verwendeten Reportergene unter der Kontrolle des 35S-Promotors tragen. Im Ergebnis der Charakterisierung der erhaltenen Linien wurden fünf Luciferaselinien und eine GUS-Linie mit nahezu vollständiger Transgeninaktivierung sowie eine Luciferaselinie und eine GUS-Linie mit stark reduzierter Transgenexpression für weiterführende Experimente ausgewählt. Mit Hilfe der vollständig inaktivierten Luciferaselinien wurde in einem EMS-Mutageneseexperiment nach TGS-Suppressormutationen gesucht. Durch die Verwendung von Luciferase als transgenen Reporter mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze und guter Quantifizierbarkeit war auch die Isolierung von Mutanten mit relativ schwacher oder organspezifischer Transgenreaktivierung möglich. Insgesamt wurden aus ca. 50000 M2-Nachkommen mutagenisierter Linien 159 putative Mutanten mit erhöhter Transgenaktivität selektiert. Im Ergebnis der Analysen zur Transgenreaktivierung an den M3-Nachkommen von 54 putativen Mutanten wurden 19 Linien zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Bei 9 der 19 näher untersuchten Mutanten wurde eine im Vergleich zur Ausgangslinie eindeutig verringerte DNA-Methylierung der Reportergene gefunden. Im Ergebnis der Kartierung der Mutationsorte von 15 Mutanten konnten 8 verschiedene Loci als wahrscheinliche Mutationsorte identifiziert werden. Bei den 9 Mutanten mit charakteristischen Veränderungen der DNA-Methylierung weisen morphologische Gemeinsamkeiten und die ermittelten Mutationsorte auf Allelien mit den bereits bekannten *Silencing*-Modifikatoren *DDMI*, *MET1* bzw. *CMT3* hin. Für weitere 6 Mutanten, die an 5 verschiedenen Loci kartieren, kann aufgrund der genomischen Lokalisation eine Allelie zu bereits bekannten Modifikatoren für *Gene Silencing* ausgeschlossen werden. Bei zwei dieser Mutanten wurden Punktmutationen im *TTG2-* (*transparent testa glabra 2*) Locus als Ursache für eine gewebespezifische TGS-Suppression identifiziert. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das

TTG2-Genprodukt in *Arabidopsis* gewebespezifisch an der Kontrolle von TGS in Zellen beteiligt ist, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickelt haben.

Die molekulare Charakterisierung von *bru1-2*, einer weiteren im Rahmen dieser Arbeit neu isolierten TGS-Suppressormutante, erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. Paskowski (Friedrich Miescher Institut Basel). *Bru1* ist nach *mom* und der im Rahmen dieser Arbeit als TGS-Suppressoren identifizierten *ttg2*-Allele eine weitere *Silencing*-supprimierende Mutante, bei der keine Veränderung der DNA-Methylierung beobachtet wird. Das vom *BRU1*-Gen abgeleitete Protein zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen mit bekannter Funktion.

Im Rahmen einer Kooperation wurde das in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Reuter (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) bearbeitete *Arabidopsis*-SET-Domänen-Protein SUVH2 hinsichtlich seiner Wirkung auf das TGS-System getestet. Dazu wurden Kreuzungen zwischen den partiell inaktivierten *Silencing*-Linien und Pflanzen mit transgener Überexpression von SUVH2 hinsichtlich möglicher Veränderungen der Reportergenexpression untersucht. Im Ergebnis dieser Versuche konnte gezeigt werden, daß die transgene Überexpression von SUVH2 verstärkend auf TGS wirkt.

6 Literatur

- Akhtar, A., Zink, D., Becker, P.B.: Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407 (2000): 405-409.
- Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P., Miller, J.H.: On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* 29 (1982): 319-328.
- Allshire, R.C., Javerzat, J.P., Redhead, N.J., Cranston, G.: Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* 76 (1994): 157-169.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (1990): 403-410.
- Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Scheid, O.M., Paszkowski, J.: Disruption of the plant gene *MOM* releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 405 (2000): 203-206.
- Arabidopsis* Genom Initiative: Analysis of the Genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (2000): 796-815.
- Assaad, F.F., Signer, E.R.: Somatic and germinal recombination of a direct repeat in *Arabidopsis*. *Genetics* 132 (1992): 553-566.
- Assaad, F.F., Tucker, K.L., Singer, E.R.: Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993): 1067-1085.
- Ayoub, N., Noma, K., Isaac, S., Kahan, T., Grewal, S.I., Cohen, A.: A novel jmjC domain protein modulates heterochromatization in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 23 (2003): 4356-4370.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T.: Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410 (2001): 120-124.
- Bartee, L., Malagnac, F., Bender, J.: *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev.* 15 (2001): 1753-1758.
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G., Aalen, R.B.: The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucl. Acids Res.* 29 (2001): 4319-4333.

- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.: In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316 (1993): 1194-1199.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R.: New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20 (1992): 1195-1197.
- Bell, C.J., Ecker, J.R.: Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics 19 (1994): 137-144.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409 (2001): 363-366.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., Ingram, V.: Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. J. Mol. Biol. 203 (1988): 971-983.
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf, M.: A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. Nature 397 (1999): 579-583.
- Bi, X., Liu, L.F.: DNA rearrangement mediated by inverted repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996): 819-823.
- Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., Cote, J.: Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. Genes Dev. 17 (2003): 1415-1428.
- Brandstädter, J., Roszbach, C., Theres, K.: The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. Planta, 192 (1994): 69-74.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., Broach, J.R.: Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. Genes Dev. 7 (1993): 592-604.
- Brink, R.A.: Paramutation. Annu. Rev. Genet. 7 (1973): 129-152.
- Cao, X., Jacobson, S.E.: Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. Curr. Biol. 12 (2002 a): 1138-1144.
- Cao, X., Jacobson, S.E.: Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the *DRM* and *CMT3* methyltransferase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002 b): 16491-16498.
- Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S., Jacobson, S.E.: Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000): 4979-4984.

- Catcheside, D.G.: A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 38 (1938): 345-352.
- Catcheside, D.G.: A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 48 (1949): 31-42.
- Chen, C., Chen, Z.: Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42 (2000): 387-396.
- Chen, Z.J., Pikaard, C.S.: Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histon modification in nucleolar dominance. *Genes Dev.* 11 (1997): 2124-2136.
- Clough, S.J., Bent, A.F.: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (1998): 735-743.
- Culbertson, M.R.: RNA surveillance: unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* 15 (1999): 74-80.
- Davies, G.J., Sheikh, M.A., Ratcliffe, O.J., Coupland, G., Furner, I.J.: Genetics of homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: a role for methylation. *Plant J.* 12 (1997): 791-804.
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker, A.: The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J.* 20 (1999): 295-304.
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker, A.: T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J.* 11 (1997): 15-29.
- Dehio, C. and Schell, J.: Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994): 5538-5542.
- Depicker, A., Montagu, M.V.: Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9 (1997): 373-382.
- Deroles, S.C., Gardner, R.C.: Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 11 (1988): 355-364.
- Dickey, L.F., Nguyen, T.T., Allen, G.C., Thompson, W.F.: Light modulation of ferredoxin mRNA abundance requires an open reading frame. *Plant Cell* 6 (1994): 1171-1176.
- Domeier, M.E., Morse, D.P., Knight, S.W., Portereiko, M., Bass, B.L., Mango, S.E.: A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 289 (2000): 1928-1931.

- Dorer, D.R., Henikoff, S.: Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77 (1994): 993-1002.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., Elgin, S.C.R.: Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990): 9923-9927.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G., Allshire, R.C.: Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91 (1997): 1021-1032.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E.: The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5 (2000): 199-206.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C., Vaucheret, H.: AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000): 11650-11654.
- Fagard, M., Vaucheret, H.: Systemic silencing signal(s). *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 285-293.
- Finnegan, E.J., Dennis, E.S.: Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* 21 (1993): 2383-2388.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., Dennis, E.S.: DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998): 223-247.
- Finnegan, E.J., Kovac, K.A.: Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 189-201.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J., Dennis, E.S.: Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 8449-8454.
- Flavell, R.B.: Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994): 3490-3496.
- Furner, I.J., Sheikh, M.A., Collett, C.E.: Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* 149 (1998): 651-662.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D., Grandjean, O.: Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128 (2001): 4847-4858.

- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., Coupland, G.: A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386 (1997): 44-51.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., Zakian, V.A.: Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of *Pol II* transcription. *Cell* 63 (1990): 751-762.
- Goyon, C., Nogueira, T.I., Faugeron, G.: Perpetuation of cytosine methylation in *Ascobolus immersus* implies a novel type of maintenance methylase. *J. Mol. Biol.* 240 (1994): 42-51.
- Grigliatti, T.: Position-effect variegation - an assay for nonhistone chromosomal proteins and chromatin assembly and modifying factors. *Methods Cell Biol.* 35 (1991): 587-627.
- Grunstein, M.: Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93 (1998): 325-328.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C.: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (1999): 950-951.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., Hodge, S.: 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 (1997): 2122-2127.
- Heberle-Bors, E., Charvat, B., Thompson, D., Scherthaner, J.P., Barta, A., Matzke A.J.M., Matzke, M.A.: Genetic analysis of T-DNA insertions into the tobacco genome. *Plant Cell Rep.* 7 (1988): 571-574.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., Grunstein, M.: Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80 (1995): 583-592.
- Henikoff, S., Comai, L.: A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149 (1998): 307-318.
- Hentze, M.W., Kulozik, A.E.: A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96 (1999): 307-310.
- Hobbs, S.L., Kpodar, P., DeLong, C.M.: The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* 15 (1990): 851-864.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L.: Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 20 (1988): 9877.

- Holmes, D.S., Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 (1981): 193-197.
- Ilgenfritz, H., Bouyer, D., Schnittger, A., Mathur, J., Kirik, V., Schwab, B., Chua, N.H., Jurgens, G., Hulskamp, M.: The *Arabidopsis* STICHEL gene is a regulator of trichome branch number and encodes a novel protein. *Plant Physiol.* 131 (2003): 643-655.
- Ishii, K., Laemmli, U.K.: Structural and dynamic functions establish chromatin domains. *Mol. Cell* 11 (2003): 237-248.
- Isshiki, M., Yamamoto, Y., Satoh, H., Shimamoto, K.: Nonsense-mediated decay of mutant *waxy* mRNA in rice. *Plant Physiol.* 125 (2001): 1388-1395.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E.: Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416 (2002): 556-560.
- Jacobsen, S.E., Meyerowitz, E.M.: Hypermethylated *superman* epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277 (1997): 1100-1103.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards, E.J.: Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genet.* 22 (1999): 94-96.
- Jofuku, K.D., Schipper, R.D., Goldberg, R.B.: A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. *Plant Cell* 1 (1989): 427-435.
- Johnson, C.S., Kolevski, B., Smyth, D.R.: TRANSPARENT TESTA GLABRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14 (2002): 1359-1375.
- Jones, J.D.G., Gilbert, D.E., Grady, K.L., Jorgensen, R.A.: T-DNA structure and gene expression in *Petunia* plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 204 (1987): 478-485.
- Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J., Baulcombe, D.C.: RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11 (1999): 2291-2301.
- Jones, P.A.: Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 40 (1985): 485-486.
- Jorgensen, R., Snyder, C., Jones, J.D.G.: T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207 (1987): 471-477.
- Kakutani, T., Jeddeloh, J.A., Richards, E.J.: Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucl. Acids Res.* 23 (1995): 130-137.

- Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B., Araki, T.: FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104 (2001): 131-142.
- Kilby, N.J., Leyser, H.M.O., Furner, I.J.: Promotor methylation and progressive transgene inaktivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20 (1992): 103-112.
- Kingston, R.E., Bunker, C.A., Imbalzano, A.N.: Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 10 (1996): 905-920.
- Koncz, C., Schell, J.: The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986): 383-396.
- Krizkova, L., Hroudá, M.: Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J.* 16 (1998): 673-680.
- Kumapata, S.P., Teng, W., Buchholz, W.G., Hall, T.C.: Epigenetic transcriptional silencing and 5-Azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in Rice. *Plant Physiol.* 115 (1997): 361-373.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., Allis, C.D.: Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383 (1996): 269-272.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T.: Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410 (2001): 116-120.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., Jenuwein, T.: Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* 16 (1997): 3219-3232.
- Leach, D.R.: Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *Bioessays* 16 (1994): 893-900.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., Wolffe, A.P.: 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72 (1993): 73-84.
- Leyser, H.M.O., Furner, I.J.: Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 119 (1992): 397-403.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., Jacobsen, S.E.: Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292 (2001): 2077-2080.

- Linn, F., Heidmann, I., Saedler, H., Meyer, P.: Epigenetic changes in the expression of the maize *A1* gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* 222 (1990): 329-336.
- Lipardi, C., Wei, Q., Paterson, B.M.: RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107 (2001): 297-307.
- Mallory, A.C., Mlotshwa, S., Bowman, L.H., Vance, V.B.: The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.* 35 (2003): 82-92.
- Mandel, M., Higa, A.: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 (1970): 159-162.
- Maquat, L.E.: When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1 (1995): 453-465.
- Martienssen, R.: Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends Genet.* 14 (1998): 263-264.
- Matzke, A.J., Matzke, M.A.: Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998): 142-148.
- Matzke, A.J., Neuhuber, F., Park, Y.D., Ambros, P.F., Matzke, M.A.: Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* 244 (1994): 219-229.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.: Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? *Trends Genet.* 11 (1995): 1-3.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Kooter, J.M.: RNA: guiding gene silencing. *Science* 293 (2001): 1080-1083.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J, Matzke, A.J.: Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8 (1989): 643-649.
- Meyer, P., Saedler, H.: Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996): 23-48.
- Meyer, P., Niedenhof, I., Ten Lohuis, M.: Evidence for cytosine methylation of symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *EMBO J.* 13 (1994): 2084-2088.
- Meyer, P.: Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 221-234.

- Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J., Potrykus, I.: Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 228 (1991): 104-112.
- Mittelsten Scheid, O., Jakovleva, L., Afsar, K., Maluszynska, Y., Paszkowski, J.: A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 35 (1996): 7114-7119.
- Mittelsten Scheid, O., Afsar, K., Paszkowski, J.: Release of epigenetic gene silencing by *trans*-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (1998): 632-637.
- Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J.: Transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 235-241.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Beclin, C., Vaucheret, H.: DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 10 (2000): 1591-1594.
- Muller, H.J.: Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 22 (1930): 299-334.
- Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 (1962): 473-497.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., Lepiniec, L.: The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* 12 (2000): 1863-1878.
- Paro, R.: Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5 (1993): 999-1005.
- Pidoux, A.L., Richardson, W., Allshire, R.C.: Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 161 (2003): 295-307.
- Ramsahoye, B.H., Biniszkievicz, D., Lyco, F., Clark, V., Bird, A.P., Jaenisch, R.: Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97 (2000): 5237-5242.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T.: Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406 (2000): 593-599.
- Reuter, G., Spierer, P.: Position-effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays* 14 (1992): 605-612.

- Richards, E.J., Elgin, S.C.: Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108 (2002): 489-500.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.: *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290 (2000): 2105-2110.
- Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J., Dellaporta, S.L.: Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273 (1996): 654-657.
- Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., Hooley, R.: Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of *alpha-Amy2* genes. *Plant Mol. Biol.* 29 (1995): 691-702.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E.: Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (1998): 311-315.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.: Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15 (1996): 5690-5700.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., Bennetzen, J.L.: Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274 (1996): 765-768.
- Santi, D.V., Garrett, C.E., Barr, P.J.: On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyl transferases by cytosine analogs. *Cell* 2 (1983): 9-10.
- Schmidt, R., Willmitzer, L.: High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* 7 (1988): 583-586.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G.: Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21 (2002): 1121-1131.
- Schuber, D.: Transgen-Silencing in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*: Ursachen und Mechanismen. Dissertation (2002). Universität zu Köln.
- Schultz, J.: Variegation in *Drosophila* and the inert chromosome regions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 22 (1936): 27-33.

- Selker, E.U., Fritz, D.Y., Singer, M.J.: Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. *Science* 262 (1993): 1724-1728.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A.: On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107 (2001): 465-76.
- Springer, N.M., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pandey, R., Cone, K.C., Chandler, V.L., Kaeppler, H.F., Kaeppler, S.M.: Comparative analysis of SET domain proteins in Maize and *Arabidopsis* reveals multiple duplications preceding the divergence of monocots and dicots. *Plant Physiol.* 132 (2003): 907-925.
- Spofford, J.B.: Position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London (1976): 955-1019.
- Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Scheid, O.M., Paszkowski, J.: Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (2000): 1165-1178.
- Stam, M., Mol, J.N.M., Kooter, J.M.: The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79 (1997): 3-12.
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Scheel, D., Angelis, K.J., Shibahara, K., Kaya, H., Araki, T., Aline V. Probst, A.V., Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J.: BRU1, a novel nuclear factor essential for genetic and epigenetic inheritance and meristem function in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18 (2004): 782-793.
- Tartof, K.D.: Position effect variegation in yeast. *Bioessays* 16 (1994): 713-714.
- Tikhonov, A.P., SanMiguel, P.J., Nakajima, Y., Gorenstein, N.M., Bennetzen, J.L., Avramova, Z.: Colinearity and its exceptions in orthologous adh regions of maize and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999): 7409-7414.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H.: A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic. Acids Res.* 15 (1987): 5890.
- Topping, J.F., Wie, W., Lindsey, K.: Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development* 112 (1991): 1009-1019.
- Tsay, Y.-F., Frank, M.J., Page, T., Dean, C., and Crawford, N.M.: Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 260 (1993): 342-344.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., Reuter, G.: The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9*

- combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* 13 (1994): 3822-3831.
- Turner, B.M., Birley, A.J., Lavender, J.: Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69 (1992): 375-384.
- Vaucheret, H. and Fagard, M.: Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17 (2001): 29-35.
- Voinnet, O., Baulcombe, D.C.: Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389 (1997): 553.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., Richards, E.J.: *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260 (1993): 1926-1928.
- Wang, Z., Yang, P., Fan, B. and Chen, Z. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response. *Plant J.* 16 (1998): 515-522.
- Winston, F., Carlson, M.: Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.* 8 (1992): 387-391.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W.: Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17 (1989): 3469-3478.
- Wustmann, G., Szidonya, J., Taubert, H., Reuter, G.: The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 217 (1989): 520-527.
- Xiang, C., Han, P., Lutzinger, I., WANG, K., Oliver, D.J.: A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 40 (1999): 711-717.
- Ye, F., Signer E.R.: RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 10881-10886.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17174-17179.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobson, S.E.: *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299 (2003): 716-719.

7 Anhang

7.1 Herstellung der Expressionskassetten

Das Luciferase-Reportergen wurde über die Schnittstellen Nco I und Xba I aus dem Vektor pSP-*luc*⁺ in den ebenfalls Nco I und Xba I geschnittenen Vektor pRT100 kloniert. Dadurch entstand der Vektor pRT100-LUC mit einer Reporter-Expressionskassette, bestehend aus dem Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und dem CaMV-35S-Poly-A-Signal als Transkriptionsstop.

Das GUS-Reportergen wurde aus dem Vektor pGPTV-KAN über die Schnittstellen Ecl 136 II (Sst I) und Sma I in den Sma I geschnittenen Vektor pRT101 kloniert, so daß der Vektor pRT101-GUS entstand.

Das GFP-Reportergen wurde zunächst mit Hilfe der Schnittstellen Hind III und Ecl 136 II aus dem Vektor pBIN m-gfp5-ER isoliert und in Hind III und Sma I geschnittenen Vektor pRT101 ligiert. Anschließend wurde das Gen über die flankierenden Bam HI-Schnittstellen noch einmal in ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektor pRT100 umklont. Zuletzt wurde zur Beseitigung unerwünschter Schnittstellen in diesem Vektor pRT100-GFP durch Restriktion mit Ecl 136 II und Sma I und anschließende Religation die Schnittstellen Ecl 136 II (Sst I), Kpn I und Sma I deletiert, so daß der Vektor pRT100-EX-GFP entstand.

7.2 Modifizierung des Vektors pGPTV-KAN

Zur Vorbereitung auf die Klonierung der verschiedenen Expressionskassetten wurde zunächst von der T-DNA des binären Transformationsvektors pGPTV-KAN das GUS-Reportergen und das pAnos-Transkriptionsterminationssignal durch Restriktion mit Eco RI und Sma I deletiert. Das nach der Eco RI-Restriktion überhängende Ende wurde mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und der Vektor als pGPTV-KAN-EX durch *blunt-end* Ligation rezirkularisiert.

Zur Klonierung der GFP-Expressionskassetten wurde dieser Vektor darüber hinaus noch durch das Einfügen einer MCS (*multicloning site*) in die Bam HI-Schnittstelle am 3'-Ende von *NPT II* modifiziert. Dadurch wurde das Ersetzen des *NPT II*-Terminators pAg7 durch den pAnos-Terminator erforderlich. Deshalb wurde zunächst das pAnos-Transkriptionsterminationssignal aus dem Vektor pGPTV-KAN durch Restriktion mit

Eco RI und Sst I isoliert und in Eco RI und Sma I geschnittenen pBluescript-Vektor ligiert. In den so entstandenen Vektor pBluescript-pAnos wurde die MCS des Vektors pGEM über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Eco RI kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-Multi entstand. Anschließend wurde ein Bam HI-Fragment dieses Vektors, das den pAnos-Terminator und einen Teil der MCS repräsentiert, in den ebenfalls Bam HI geschnittenen pGPTV-KAN-EX ligiert, so daß der Vektor pGPTV-KAN-EX-Multi entstand.

7.3 Herstellung der T-DNA-Konstrukte

Konstrukt LUC 1:

Die Luciferase-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT100-LUC über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN und pGPTV-LUC(←)-KAN (Konstrukt LUC 1) mit der Luciferase-Expressionskassette jeweils in verschiedener Orientierungen auf der T-DNA entstanden.

Konstrukte LUC 2 und LUC 3:

Zunächst wurde die Luciferase-Expressionskassette aus pRT100-LUC über die Schnittstellen Pst I und Hinc II in den ebenfalls Pst I und Hinc II geschnittenen Vektor pGEM kloniert. Aus dem so entstandenen Vektor pGEM-LUC wurde die Expressionskassette über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Kpn I in den oben beschriebenen Vektor pBluescript-pAnos kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-LUC entstand. Anschließend wurde aus diesem Vektor ein aus der Luciferase-Expressionskassette und dem pAnos-Signal bestehendes Bam HI-Fragment in die ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN und pGPTV-LUC(←)-KAN ligiert, so daß die Vektoren pGPTV-LUC(→)-KAN-LUC(←) (Konstrukt LUC 2) und pGPTV-LUC(←)-KAN-LUC(←) (Konstrukt LUC 3) entstanden.

Konstrukte LUC 4 und LUC 5:

Zur Herstellung des 2xLUC-Motivs dieser Konstrukte wurde eine Luciferase-Expressionskassette aus pRT100-LUC über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT100-

LUC ligiert, so daß der Vektor pRT100-2xLUC entstand. Zur Konstruktion des Vektors pGEM-2xLUC wurde die LUC-Expressionskassette ebenfalls über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in den mit Pst I geschnittenen Vektor pGEM-LUC kloniert. Anschließend wurde die 2xLUC-Kassette aus dem Vektor pRT100-2xLUC über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN und pGPTV-2xLUC(→)-KAN mit den zwei Luciferase-Expressionskassetten jeweils in entgegengesetzter Orientierungen auf der T-DNA entstanden. Weiterhin wurde die 2xLUC-Kassette des Vektors pGEM-2xLUC als ein Hind III-Kpn I-Fragment in den Vektor pBluescript-pAnos kloniert, so daß der Vektor pBluescript-pAnos-2xLUC entstand. Zuletzt wurde aus diesem Vektor ein aus der 2xLUC-Kassette und dem pAnos-Signal bestehendes Bam HI-Fragment in die ebenfalls Bam HI geschnittenen Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN und pGPTV-2xLUC(→)-KAN ligiert, so daß die Vektoren pGPTV-2xLUC(←)-KAN-2xLUC(←) (Konstrukt LUC 4) und pGPTV-2xLUC(→)-KAN-2xLUC(←) (Konstrukt LUC 5) entstanden.

Konstrukt GUS 1:

Die GUS-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT101-GUS über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GUS-KAN (Konstrukt GUS 1) entstand.

Konstrukte GUS 2 und GUS 3:

Zur Herstellung des 2xGUS- bzw. 3xGUS-Motives dieser Konstrukte wurde die GUS-Expressionskassetten aus pRT101-GUS über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT101-GUS kloniert, so daß die Vektoren pRT101-2xGUS und pRT101-3xGUS entstanden. Um die Wahrscheinlichkeit der Entstehung des 3xGUS-Motives zu erhöhen, wurde mit einem ca. zwanzigfachen Fragmentüberschuß ligiert. Anschließend wurde die 2xGUS bzw. 3xGUS-Kassette aus dem entsprechenden Vektor über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xGUS-KAN (Konstrukt GUS 2) bzw. pGPTV-3xGUS-KAN (Konstrukt GUS 3) entstanden.

Konstrukt GFP 1:

Die GFP-Expressionskassette wurde aus dem Vektor pRT100-EX-GFP über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen Vektor pGPTV-KAN-EX-Multi kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GFP-KAN-Multi (Konstrukt GFP 1) entstand.

Konstrukt GFP 2:

Zunächst wurde die GFP-Kassette aus pRT100-EX-GFP über die flankierenden Hind III-Schnittstellen isoliert und die nach der Restriktion überhängenden Enden des Fragments mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde dieses Fragment in Sma I geschnittenen Vektor pGPTV GFP-KAN-Multi kloniert, so daß der Vektor pGPTV-GFP-KAN-GFP-Multi (Konstrukt GFP 2) entstand.

Konstrukte GFP 3 und GFP 4:

Zur Herstellung des 2xGFP- bzw. 3xGFP-Motives dieser Konstrukte wurde die GFP-Expressionskassetten aus pRT100-EX-GFP über die flankierenden Pst I-Schnittstellen in durch partielle Restriktion nur einer Pst I-Schnittstelle linearisierten Vektor pRT100-EX-GFP kloniert, so daß die Vektoren pRT100-EX-2xGFP und pRT100-EX-3xGFP entstanden. Um die Wahrscheinlichkeit der Entstehung des 3xGFP-Motives zu erhöhen, wurde mit einem ca. zwanzigfachen Fragmentüberschuß ligiert. Anschließend wurde die 2xGFP bzw. 3xGFP-Kassette aus dem entsprechenden Vektor über die flankierenden Hind III-Schnittstellen in den ebenfalls Hind III geschnittenen pGPTV-KAN-EX kloniert, so daß die Vektoren pGPTV-2xGFP-KAN (Konstrukt GFP 3) bzw. pGPTV-3xGFP-KAN (Konstrukt GFP 4) entstanden.

Konstrukt zur transgenen Expression von *TTG2*

Zur transgenen Expression von *TTG2* (Locus F3G5.5) wurde ein genomischer Klon des Wildtypallels (s. Kap. 3.5) mit Hilfe der auf den Primern WRKY2 F und WRKY2 R vorgesehenen Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen Xho I und BamH I aus dem Klonierungsvektor pCR2.1 ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pRT100 ligiert. Die entstandene Expressionskassette aus CaMV-35S-Promotor, *TTG2*-Gen und CaMV-Poly-A-Signal wurde über die beiden flankierenden Pst I-Schnittstellen in die T-DNA des binären Vektors pCB302 kloniert. Anschließend wurde unter Verwendung der Primer WRKY-Promo und WRKY2 R ein 2640 bp genomisches Fragment amplifiziert, welches neben dem *TTG 2*-Gen ca. 1 kb der Promotorregion dieses Gens repräsentiert.

Da diese PCR mit *Pfu*-Polymerase an genomischer DNA keine hinreichenden Produktmengen lieferte, wurde 0,5 µl einer Plasmidpräparation des BAC-Klons F3G5, der den entsprechenden Bereich des *Arabidopsis*-Genoms beinhaltet, als Template verwendet. Durch Nutzung der endogen in diesem Fragment vorhandenen Restriktionsschnittstellen für EcoR I (1001 bp *upstream* des vorhergesagten Translationsstarts) und Hind III (93 bp *downstream* des vorhergesagten Translationsstarts) wurde ein 1094 bp-Fragment erzeugt, das die Promotorregion von *TTG2* repräsentiert. Anschließend wurde der binäre Vektor pCB302 mit der CaMV-35S-*TTG2*-Expressionkassette ebenfalls mit EcoR I und partiell Hind III geschnitten und der CaMV-35S-Promotor durch das endogene Promotorfragment ersetzt.

7.4 Verwendete molekulare Marker

Tab. 7: Verzeichnis der verwendeten molekularen Marker.

Name	Marker-Typ	Assoziierter Locus	Referenz	Primer-Sequenzen
NGA63	SSLP	At1g09910	Bell und Ecker (1994)	ACCCAAGTGATCGCCACC AACCAAGGCACAGAAGCG
NGA248	SSLP	At1g28280	Bell und Ecker (1994)	TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC TACCGAACCAAAACACAAAGG
T27K12-SP6	SSLP	At1g42460	Bell und Ecker (1994)	GGAGGCTATACGAATCTTGACA GGACAACGTCTCAAACGGTT
NGA280	SSLP	At1g55840	Bell und Ecker (1994)	GGCTCCATAAAAAGTGCACC CTGATCTCACGGACAATAGTGC
F5I14-49495	SSLP	At1g65550	Joseph Ecker (TAIR Accession: Person 4624)	CTGCCTGAAATTGTCGAAAC GGCATCACAGTTCTGATTCC
NGA111	SSLP	At1g72650	Bell und Ecker (1994)	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG
NGA1145	SSLP	At2g02540	Bell und Ecker (1994)	GCACATACCCACAACCAGAA CCTTCACATCCAAAACCCAC
CIW3	SSLP	At2g14890	Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556)	GAAACTCAATGAAATCCACTT TGAACCTGTTGTGAGCTTTGA
PLS2	SSLP	At2g29290	Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602)	TACGCGAATTATTTTTAGGAGA AATTTATTTTGAGTCGGATGC
PLS7	SSLP	At2g23030	Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602)	GATGAATCTTCTCGTCCAAAAT GACAACTAAACAACATCCTTCTT
NGA1126	SSLP	At2g27330	Bell und Ecker (1994)	GCACAGTCCAAGTCACAACC CGCTACGCTTTTCGGTAAAG
NGA361	SSLP	At2g31070	Bell und Ecker (1994)	ACATATCAATATATATAAGTAGC AAAGAGATGAGAATTTGGAC
M323	CAPS (Mbol)	At2g35580	Punita Nagpal (TAIR Accession: Person 5761)	GCTTTGCTTGGCTTGAACAG CGTTGAAGAAGCCTGAAGT
VE017	CAPS (PstI)	At2g36830	Oliver Vugrek (TAIR Accession: Person 1333)	GAGCAATCCAGTAGAGGATA CTTGAAGCTTAAATCTCAGC

Fortsetzung Tab. 7

SNP T1J8	SSLP	At2g36920	abgeleitet von CER459104	GCGGATGATGAATTTAGGCTCCG GTATGAGGGACTAATGAGACCGC
SNP T2N18	SSLP	At2g37050	abgeleitet von CER460216	CTCATGATACAGAAAAGGTG GCGGAAGCTGAAGATACAAGAC
SNP F3G5	SSLP	At2g37410	abgeleitet von CER451984	TTGCCCAAAGTAAAGAAAAG AAGACGGGTAAACAGACAACAACA
SNP F13M22	CAPS (BclI)	At2g37585	abgeleitet von CER449020	GCTCATGGTTAGGCTTCTT ACGCAAACATTCTCCACAC
T8P21 E	CAPS (SspI)	At2g37720	abgeleitet von CER425265	GTTGAAGTTCAAGATCCG CTATATCAAGAGGTGGGC
NGA168	SSLP	At2g39010	Bell und Ecker (1994)	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG TCGTCTACTGCACTGCCG
T7D17	CAPS (BglII)	At2g40800	Julie Nardone (TAIR Accession: Person 5079)	GCCATAAGGAACTTTTTGTGTC GAGGACATCTTTATCAAACC
BIO2	SSLP	At2g43360	Bell und Ecker (1994)	TTAACAGAAACCCAAAGCTTTC TGACCTCCTCTTCCATGGAG
NGA172	SSLP	At3g03340	Bell und Ecker (1994)	CATCCGAATGCCATTGTTC AGCTGCTTCCTTATAGCGTCC
NGA126	SSLP	At3g10050	Bell und Ecker (1994)	CAAGAGCAATATCAAGAGCAGC GAAAAACGCTACTTTCGTGG
NGA162	SSLP	At3g13960	Bell und Ecker (1994)	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG CATGCAATTTGCATCTGAGG
SNP K14A17	SSLP	At3g17150	abgeleitet von CER454965	AAATTTTAATCGGTGAAGTTGTTGTT CTTAGAGACGGAGATGAGATAGTTA
SNP MKP6	SSLP	At3g17580	abgeleitet von CER456162	TTAAAATCAACATCAAAACAACAAA TGATCTATTAAGTACACAAAAGTCTC
SNP MEB5	SSLP	At3g17880	abgeleitet von CER455528	AAAAGTAAAATGGGAAAAGATAAAACA ATACCTCGCCCTACTCGCAACATA
SNP MRC8	SSLP	At3g18210	abgeleitet von CER456919	ACTGTGCCTTTGAGCCTGTAGC CTGGTTAGATGATGGTTGGTAGAAGATA
SNP MYF24	SSLP	At3g18530	abgeleitet von CER457760	AAAAACCCACTAAAACCAATAATA CCAGAGGCCTCAAAACATAAT
SNP MVE11	SSLP	At3g18770	abgeleitet von CER457440	CAAGTAAATTAGTGAGCCGAGGACGAC GGAGGAAACAAAACAGATTAAGAGAA
SNP MCB22	SSLP	At3g18850	abgeleitet von CER477120	GCGAGCCACGAGCCAAAGA CCTGCAGGTGAAGTATGTTGTGTT
SNP MLD14	SSLP	At3g19460	abgeleitet von CER456185	GCTACAGTTCTCAACCGTAAATCTCTGC ACCTTGAAACGAAACTGTTGGGCTCAGT
ATDMC1	SSLP	At3g22880	Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602)	GCAACTGAATTTGTTTTCGTTTG TTGATTAGTGATCCGCAAACAA
SNP F5N5	SSLP	At3g22890	abgeleitet von CER473922	TAGCCAAGTACAAAACGAT TCCCATACATATAGAAAAGCCAAAGT
G4711	CAPS (HindIII)	At3g24620	Eva Huala (TAIR Accession: Person 4602)	CCTGTGAAAACGACGTGCAGTTTC ACCAAATCTTCGTGGGCTCAGCAG
GAPAB	SSLP	At3g26650	Bell und Ecker (1994)	TCCTGAGAATTCAGTGAACCC CACCATGGCTTCGGTACTT
NGA6	SSLP	At3g62220	Bell und Ecker (1994)	ATGGAGAAGCTTACACTGATC TGGATTTCTTCTCTCTTCAC
NGA8	SSLP	At4g08830	Bell und Ecker (1994)	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC GAGGGCAAATCTTTATTTCCG

Fortsetzung Tab. 7

NGA1139	SSLP	At4g34390	Bell und Ecker (1994)	TTTTTCCTTGTGTTGCATTCC TAGCCGGATGAGTTGGTACC
NGA151	SSLP	At5g14480	Bell und Ecker (1994)	CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG
SO262	SSLP	At5g27670	Bell und Ecker (1994)	ATCATCTGCCCATGGTTTTT TTGCTTTTTGGTTATATTCGGA
NGA76	SSLP	At5g28470	Bell und Ecker (1994)	AGGCATGGGAGACATTTACG GGAGAAAATGTCACCTCCACC
SNP T2L5	SSLP	At5g34890	abgeleitet von CER460190	ATGCCGTCGGAAATAGTGAG CGAAGCTGAAGCAAATGTCA
SO191	SSLP	At5g37780	Bell und Ecker (1994)	CTCCACCAATCATGCAAATG TGATGTTGATGGAGATGGTCA
CIW9	SSLP	At5g42600	Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556)	CAGACGTATCAAATGACAAATG GACTACTGCTCAAATATTCGG
CER 454907	SSLP	At5g49960	abgeleitet von CER454907	AATCATTTTTACCGCCACAA GACAGTCATCGCATAAAATAAAGAAT
CER 455613	SSLP	At5g50780	abgeleitet von CER455613	TTGGGGAAGTTGTAAGCAGT CATGATCAAAGCCACCTAAAACCACAAT
CER 455938	SSLP	At5g51790	abgeleitet von CER455938	AGCTTTCGAATATTTATGGTGGTG CAATGATAAAATGAGTGAAGGAACAA
CER 457042	SSLP	At5g52070	abgeleitet von CER457042	ACGTGAGTAGGAGGAAGC TGGACATGGATAAAAGCACAA
CER 457578	SSLP	At5g52880	abgeleitet von CER457578	AACAGTGTAGCAGAAAAGGATTA GAAAGTGGGGTAGGTTAGTTG
CER 454368	SSLP	At5g53360	abgeleitet von CER454368	TATGTTCAACCTGTAAATCAAGA CAGCACACTCCGAGCCAGCATA
CER 456100	SSLP	At5g54095	abgeleitet von CER456100	TCCTCTTGTTTTGGTGGCTCAGTC AGTTGTCACAGAAAAGAAGGAAGA
CIW10	SSLP	At5g60960	Stewart Gillmor (TAIR Accession: Person 6556)	CCACATTTTCCTTCTTTCATA CAACATTTAGCAAATCAACTT
MBK-5	SSLP	At5g63640	Bell und Ecker (1994)	GAGCATTTACAGAGACG ATCACTGTTGTTTACCATTA
SNP K1F13	SSLP	At5g66430	abgeleitet von CER454435	GACTCCAGACACGAAGCACA GATGGCTGAGATCGTGAACA
SNP MUD21	SSLP	At5g66850	abgeleitet von CER457294	CCCCTTCAAACCTCACTCCAA GTACTGGATGGCACCAGAGG
SNP K3G17	SSLP	At5g67260	abgeleitet von CER454685	TCCTTTGTTGTTTTGTTCAATCTT TCGAACCTGTCTCGCTTCTT

7.5 Primer für Klonierung und Sequenzierung

Tab. 8: Verzeichnis der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Primer.

Name	Sequenz
WRKY F3G5 F	CGTGCTTCATCATCAATCTCTCA
WRKY F3G5 R	CATTGCCTCCTACCACTTTTTGTC
WRKY-Promo	GACGAATCACAAAGGCAAGGAAGAAGTAG
WRKY2 F	CTCGAGGCTGAAGTAAAAGGTATTGGAAATGG
WRKY2 R	GCATGAATGGATCCTCAAATCAAATTGTTTGC

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Bettina Tschiersch für die Überlassung des interessanten Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Betrachtung des Manuskriptes während seiner Entstehungsphase.

Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am IPB, die mir ein freies und kreatives Arbeiten ermöglicht haben, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Vermittlung hilfreicher Kontakte.

Prof. Dr. Gunter Reuter danke ich für die Möglichkeit zur Fortführung der Arbeiten am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität sowie für zahlreiche interessante Diskussionen und viele neue Einblicke in die Genetik von *Drosophila melanogaster*.

Der Arbeitsgruppe Streß- und Entwicklungsbiologie am IPB gilt mein Dank für das sehr gute Arbeitsklima. Für ihre vielfältige fachliche und persönliche Unterstützung danke ich insbesondere Anne, Bärbel, Birgit, Christel, Christoph, Desy, Edda, Frederic, Norbert, Susanne und Ulla.

Der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität danke ich für die freundliche Aufnahme und dafür, daß sie mich zur Fertigstellung dieser Arbeit motiviert haben.

Bei Dr. Ursula Niesbach-Klösgen möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Kartierung der Mutationsorte bedanken.

Dr. Uta zur Nieden danke ich für die Anfertigung der immunzytologischen Aufnahmen.

Dr. Zerihun Tadele und Dr. Shin Takeda (Friedrich Miescher Institut, Basel) gilt mein Dank für die erfolgreiche Kooperation bei der Identifizierung der Mutante *bru1-2*.

Dr. David Smyth (*Monash University*, Victoria, Australien) danke ich für die Bereitstellung der Mutante *ttg2-1*.

Mein Dank gilt weiterhin allen Kollegen und Freunden, die nicht namentlich erwähnt wurden, deren Anregungen und Unterstützung jedoch maßgeblich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 29. April 2004

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ingo Hofmann
geboren: 21. Juli 1970 in Halle (Saale)
Nationalität: deutsch
Zivilstand: ledig, 1 Kind

Werdegang

1977 bis 1987 Allgemeinbildende Oberschule in Halle-Neustadt
1987 bis 1990 Berufsausbildung mit Abitur zum MSR-Techniker im Kombinat VEB Chemische Werke Buna in Schkopau
1990 bis 1991 Zivildienst als Gemeindearbeiter in Sennewitz
1991 bis 1996 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1996 bis 1997 Diplomarbeit: "Versuche zur Charakterisierung der ptDNA von *in vitro* kultivierten Plastommutanten und Ganzpflanzen" am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 bis 2001 Promotionsstudium am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale)
seit 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den 29. April 2004