

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

**Untersuchungen zur post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung
in (monokotylen und dikotylen) Pflanzen und
deren Beeinflussung zur Erhöhung der Transgen-Expression**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieurin Astrid Bruchmüller

geb. am 12.04.1981 in Quedlinburg

Gutachter: Prof. Dr. K. Pillen
Prof. Dr. A. Graner
Priv.-Doz. Dr. R. Schmidt

Verteidigung am: 30.01.2012

Halle/Saale 2010

für Tobias

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein (1879 - 1955) deutscher Physiker und Nobelpreisträger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
A Einleitung	1
A.1 Biotechnische Anwendung transgener Pflanzen	1
A.2 Gen-Inaktivierung in transgenen Pflanzen	3
A.2.1 Transkriptionelle Gen-Inaktivierung	3
A.2.2. Post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung	3
A.2.3 Mechanismus der RNA-abhängigen Gen-Inaktivierung	6
A.3 Zielsetzung	9
A.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
A.3.2 Gerste	10
B Material und Methoden	11
B.1 Material	11
B.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Primer und Kits	11
B.1.2 Puffer und Lösungen	11
B.1.3 Medien und Antibiotika	11
B.1.4 Pflanzenmaterial	14
B.1.5 Verwendetes T-DNA-Konstrukt in <i>H. vulgare</i>	15
B.2. Methoden	15
B.2.1 Kultur von <i>Hordeum vulgare</i>	15
B.2.2 Herstellung transgener Gerste	16
B.2.3 Bakterienstämme und deren Transformation	18

B.2.4	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation embryogener Pollenkulturen von Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> , cv. Igri)	19
B.2.5	Kreuzung von Gerste und Erzeugung doppelhaploider F ₁ Linien	21
B.2.6	Isolierung genomischer DNA	23
B.2.7	PCR	24
B.2.8	Southern- und Northern Analysen	26
B.2.8.1	Southern-Analysen	26
B.2.8.1	Northern-Analysen	31
B.2.9	β-Glucuronidase Expressions- und Aktivitätstest in <i>A. thaliana</i>	34
B.2.10	Bestimmung der relativen GFP-Fluoreszenz	36
B.2.11	Statistische Auswertungen	38
B.2.12	Datenbankanalysen	38
C	Ergebnisse	39
C.1	Untersuchungen zum Mechanismus der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung in <i>A. thaliana</i>	39
C.1.1	Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung eines GUS-Reportergens	39
C.1.2	Rolle von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung	47
C.2	Korrelation zwischen Kopienzahl und Expression eines Reportergens im Endosperm von Gerste	67
C.2.1	Erzeugung transgener Linien mit unterschiedlichen Kopienzahlen eines GFP Reportergens	67
C.2.2	GFP Expression im Endosperm in Abhängigkeit von der Zahl integrierter T-DNA Kopien	77

D	Diskussion	85
D.1	Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung von Transgenen in <i>A. thaliana</i>	85
D.1.1	4xGUS Pflanzen zeigen Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung	85
D.1.2	Beteiligung von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung	86
D.2.1	Homozygot-transgene Gerstenpflanzen mit verschiedenen GFP-Kopienzahlen	91
D.2.2	Korrelation zwischen Kopienzahl und Expression eines Reportergens im Endosperm von Gerste	92
E	Zusammenfassung/Summary	95
F	Literaturnachweis	99
G	Anhang	106

Publikationsliste

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis**Neutrale Aminosäuren**

A	Alanin
G	Glycin
I	Isoleucin
L	Leucin
F	Phenylalanin
P	Prolin
W	Tryptophan
V	Valin

Polare Aminosäuren

N	Asparagin
C	Cystein
Q	Glutamin
M	Methionin
S	Serin
T	Threonin
Y	Tyrosin

Basische Aminosäuren

R	Arginin
H	Histidin
K	Lysin

Saure Aminosäuren

D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure

Nucleobasen

a	Adenin
c	Cytosin
g	Guanin
t	Thymin

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus, 35S-Promotor
cm	Zentimeter
cfu	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
CSPD	3-(4-methoxy-spiro3- {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1(3,7)]decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
cv.	cultivar (Sorte)
DH	doppelhaploid
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> („und andere“)
F ₁	erste Filialgeneration
F ₂	zweite Filialgeneration
F ₃	dritte Filialgeneration
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün-Fluoreszierendes Protein)
GUS	β-Glucuronidase (<i>E. coli</i>)
h	Stunde
HPT	Hygromycin-Phosphotransferasegen
l	Liter
LB	Left Border (linker Randbereich der T-DNA)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4 Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid-Trihydrat
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaAc	Natriumacetat
NPT	Neomycin-Phosphotransferasegen
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing (post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung)
RB	Right Border (rechter Randbereich der T-DNA)
RdRP	RNA-dependent RNA-polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA-induzierter Regulationskomplex)
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Drehungen pro Minute)
sec	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natrium-Laurylsulfat)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
siRNA	small interfering RNA (kleine interferierende RNA)
T ₀	primärtransgene Pflanze
T ₁	Nachkomme von T ₀
T ₂	Nachkomme von T ₁

Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGS	Transcriptional Gene Silencing (transkriptionelle Gen-Inaktivierung)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit (Einheit)
UTR	untranslatierte Region
X-Gluc	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-Glucuronsäure
z. B.	zum Beispiel
∅	Durchmesser
♂/♀	männlich/weiblich
® und ™	registrierte Warenzeichen/Handelsmarken
1x	einfach

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. A-1: Transgene Gerstenkörner mit Expression des <i>GFP</i> -Reportergens im Endosperm.	2
Abb. A-2: PTGS–Mechanismus: Schema der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung.	8
Abb. C-1: T-DNA Konstrukt in <i>A. thaliana</i> Linie GUS 2xr 126.	39
Abb. C-2: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS Pflanzen.	41
Abb. C-3: Probenahme für die quantitativen GUS-Aktivitätstests und den histochemischen GUS-Expressionstest.	42
Abb. C-4: Vergleich der GUS-Aktivität von 2xGUS, 4xGUS und nicht transgenen Col-0 Pflanzen.	43
Abb. C-5: Histochemischer GUS-Expressionstest von 2xGUS und 4xGUS Pflanzen nach 9 Wochen Kultivierung.	44
Abb. C-6: SiRNA - und DNA Methylierungsanalyse.	46
Abb. C-7: Southern-Analyse zur Bestimmung der T-DNA-Kopienzahl in <i>rdr2-gk</i> und <i>rdr5-gk</i> Pflanzen.	49
Abb. C-8: Position der T-DNA Insertionen in den GABI-Kat Linien <i>rdr2-gk</i> und <i>rdr5-gk</i> .	50
Abb. C-9: Position der T-DNA Insertionen in den SAIL Linien <i>rdr2-1</i> und <i>rdr5-sl</i> .	51
Abb. C-10: Positionen der Punktmutationen in drei verschiedenen <i>rdr6</i> Allelen.	53
Abb. C-11: Bisulfit-Sequenzierungen der <i>AtSN1</i> -Region.	54
Abb. C-12: Schema der Einkreuzung der nicht funktionellen Allele <i>rdr2-gk</i> , <i>rdr5-gk</i> und <i>rdr6</i> in Linie GUS 2xr 126.	55
Abb. C-13: Genotypisierungs-PCR der segregierenden F ₂ Generation aus der Kreuzung von <i>rdr2-gk</i> und Linie GUS 2xr 126.	56
Abb. C-14: Vergleich der GUS-Aktivität von 4xGUS und 4xGUS <i>rdr</i> Pflanzen.	58
Abb. C-15: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS und 4xGUS <i>rdr</i> Pflanzen nach 9 Wochen.	59
Abb. C-16: Exemplarischer Nachweis von GUS <i>antisense</i> siRNA in 4xGUS und 4xGUS <i>rdr</i> Pflanzen.	60
Abb. C-17: DNA Methylierungsanalyse im 3' Bereich des <i>GUS</i> Reportergens.	61
Abb. C-18: Vergleich der GUS-Aktivität in 4xGUS und 4xGUS <i>RDR/rdr</i> Pflanzen.	63

Abb. C-19:	Histochemischer GUS-Expressionstest der 4xGUS und 4xGUS <i>RDR/rdr</i> Pflanzen nach 9 Wochen.	64
Abb. C-20:	Vergleich der GUS-Aktivität von 4xGUS und 4xGUS <i>rdr6</i> Pflanzen mit drei verschiedenen <i>rdr6</i> Allelen.	65
Abb. C-21:	Histochemischer GUS-Expressionstest der 4xGUS und 4xGUS <i>rdr6</i> Pflanzen mit drei verschiedenen <i>rdr6</i> Allelen nach 9 Wochen.	66
Abb. C-22:	T-DNA Konstrukt zur Transformation von <i>H. vulgare</i> (cv. Igri).	67
Abb. C-23:	Agrobakterien-vermittelte Transformation embryogener Pollenkulturen von Gerste.	68
Abb. C-24:	Southern-Hybridisierung zur Bestimmung der T-DNA Kopienzahl in PS und BA-Pflanzen.	70
Abb. C-25:	Southern-Analyse von T ₂ -Pflanzen der Linie BA 49.	72
Abb. C-26:	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) der Linie BA 51.	73
Abb. C-27:	Strategie zur Herstellung von homozygot transgenen PS- bzw. BA-Linien mit einer breiten Palette von T-DNA Kopienzahlen.	75
Abb. C-28:	Southernblotanalyse hemizygoter F ₁ - und doppelhaploider F ₂ Pflanzen aus der Kreuzung (PS 403xPS 387).	76
Abb. C-29:	GFP Fluoreszenz in Ähren von PS- und BA Linien im Stadium der Teigreife und Vollreife.	78
Abb. C-30:	GFP Fluoreszenz in Gerstenkaryopsen der PS-Linien im Stadium der Vollreife.	80
Abb. C-31:	GFP Fluoreszenz in unreifen und reifen Körnern der homozygot transgenen PS/BA-T ₂ -Pflanzen.	81
Abb. C-32:	Vergleich der relativen GFP Fluoreszenz in unreifen und reifen Gerstenkörnern von homozygot transgenen PS/BA Linien und nicht transgener Gerste der Sorte Igri.	83
Abb. C-33:	Versuch des Nachweises von GFP-siRNA in homozygot transgenen Gersten Linien.	84
Abb. D-1:	Rollen von RDR2 und RDR6 bei der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung.	89
Abb. D-2:	Vergleich der relativen GFP-Fluoreszenz und der T-DNA Kopienzahlen.	93

Tabellenverzeichnis	Seite
Tab. B-1: Kulturmedien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien.	12
Tab. B-2: Kulturmedium und Antibiotika für die <i>in vitro</i> Kultur von <i>Arabidopsis thaliana</i> .	12
Tab. B-3: Medien für die Agrobakterien-vermittelte Pollentransformation von Gerste.	13
Tab. B-4: Lösungen zur Isolierung von Gerstenmikrosporen.	17
Tab. B-5: PCR Ansatz zur Charakterisierung von T-DNA Insertions- und Punktmutationslinien in <i>A. thaliana</i> sowie für die Überprüfung auf integrierte T-DNA in transformierter Gerste.	24
Tab. B-6: Oligonukleotide für die Charakterisierung von T-DNA Insertions- und Punktmutationslinien in <i>A. thaliana</i> sowie den Nachweis integrierter T-DNA in transformierter Gerste.	25
Tab. B-7: Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von Hybridisierungssonden.	28
Tab. B-8: PCR Ansatz für digoxigenierte Sondenfragmente.	28
Tab. B-9: Zusammensetzung des Polyacrylamid Gels zur Auftrennung von siRNAs.	33
Tab. B-10: Puffer für den histochemischen β -Glucuronidase-Expressionstest.	34
Tab. B-11: GUS-Extraktionspuffer für den quantitativen β -Glucuronidase-Aktivitätstest.	35
Tab. C-1: <i>rdr</i> -Mutanten.	47
Tab. C-2: T-DNA Kopienzahl in homozygot transgenen PS/BA-T ₁ -Pflanzen nach Southern Analysen.	71
Tab. C-3: Ergebnisse der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) von homozygot transgenen BA-Gerstenlinien.	74

A Einleitung

A.1 Biotechnische Anwendung transgener Pflanzen

In der modernen Biotechnologie und Molekularbiologie ist die Transformation von Pflanzen neben klassischen genetischen Verfahren bereits gängige Praxis. Für industrielle und landwirtschaftliche Anwendungen gewinnen gentechnisch modifizierte Pflanzen stetig an Bedeutung. Die gentechnische Modifikation kann dabei unterschiedliche Ziele haben. Es können Pflanzen mit verbesserten agronomischen Eigenschaften hergestellt werden, die wegen ihres veränderten Genoms neue Krankheits-, Insekten-, oder Herbizidresistenzen besitzen. Transgenexpression kann aber auch den Wert von Nutzpflanzen steigern, indem gezielt gewünschte Substanzen wie Enzyme, Antikörper, Vakzine und andere industrielle Rohstoffe angereichert werden oder unerwünschte Stoffe wie bestimmte Sekundärstoffwechselprodukte verringert werden (De Wilde *et al.* 2000). Für eine wachsende Anzahl von Kulturpflanzenarten ist die Veränderung von agronomisch und ökonomisch interessanten Eigenschaften durch das Einbringen von Fremdgenen bereits möglich. Vom kommerziellen Standpunkt aus gesehen eignen sich gerade Pflanzen als „Bioreaktoren“ zur Massenproduktion von Proteinen für therapeutische und industrielle Anwendungen. Kulturpflanzen besitzen ein hohes Speicherpotential für Proteine und Fette, können eine beträchtliche Biomasse erzeugen und sind leicht anzubauen. Der Einsatz von Pflanzen ist im Vergleich zum Einsatz kostenintensiver Bioreaktoren für genetisch veränderte Bakterien, die eine teure Ausrüstung, hohe Laborkosten und gut geschultes Personal benötigen, besonders kosteneffektiv (De Wilde *et al.* 2000).

Ein besonderes Potential für die kostengünstige Herstellung größerer Mengen qualitativ hochwertiger rekombinanter Proteine haben Weizen und Gerste. Diese Getreidearten gehören zu den weltweit bedeutendsten Kulturpflanzen. Transgene Getreidepflanzen besitzen die biologischen Grundvoraussetzungen zur Deponierung von hohen Proteinmengen im Endosperm der Samen. Alle erforderlichen Produktionsverfahren einschließlich Anbau, Ernte und Lagerung sind etabliert (Knäblein und McCaman 2003). Als Bioproduktionssystem ist die Gerste besonders vorteilhaft. Sie besitzt eine außerordentlich geringe Fremdbefruchtungsrate, einen hohen Proteinertrag sowie einen hohen Futterwert und hat damit verbundenen einen guten Geschmack als Tierfutter (Franke 1997). Transgene Pflanzen sind jedoch nur dann agronomisch und ökonomisch sinnvoll, wenn die gewünschten Eigenschaften im vorgesehenen Entwicklungsstadium zuverlässig exprimiert werden. Die Instabilität der Expression von Transgenen und darüber hinaus auch von

endogenen Genen stellt einen generellen Nachteil der Verwendung von Pflanzen als Produktionssystem für heterologe Proteine dar (De Neve *et al.* 1999, De Wilde *et al.* 2000).

Die Herstellung von stabil transgenen Pflanzen ermöglicht die Expression eines Gens in vererbbarer Weise über Generationen hinweg. Entsprechende Genkonstrukte können mittels *Agrobacterium tumefaciens* – vermitteltem oder mittels biolistischem Gentransfers in das Genom einer Zelle integriert werden (Shrawat und Lörz 2006). Durch Gabe von Phytohormonen wird dann die Regeneration von Pflanzen aus einzelnen transformierten Zellen angeregt. Dabei wird durch Selektion auf die Anwesenheit mittransferierter Resistenzmarker sichergestellt, dass nur stabil transgenes Material überlebt. Die regenerierten Pflanzen werden mit molekularbiologischen Methoden auf die Anwesenheit des eingebrachten Konstrukts getestet und durch sexuelle oder vegetative Reproduktion vermehrt. Die Erzeugung von transgenen Pflanzen ist zwar zeitaufwendig, die eingebrachten Konstrukte werden aber fest im Genom der Pflanzen integriert und sind damit langfristig nutzbar.

Durch die geeignete Wahl des Promoters kann ein Transgen konstitutiv in der gesamten Pflanze oder begrenzt in einem bestimmten Gewebe (z. B. Endosperm, Abb. A-1) oder unter einen bestimmten physiologischen Zustand exprimiert werden (Goedeke *et al.* 2007).



Abbildung A-1: Transgene Gerstenkörner mit Expression des GFP-Reportergens im Endosperm. Die reifen transgenen Gerstenkörner zeigen GFP-Fluoreszenz im Endosperm. Die GFP-Expression erfolgte unter der Kontrolle des Endosperm-spezifischen alpha-gliadin Promoters aus Weizen. WL und UVL („Blue light + GFP-filter set“): „white“ und UV Licht (Kumlehn unveröffentlicht).

A.2 Gen-Inaktivierung in transgenen Pflanzen

Die Grundlage für die Koordination vieler biologischer Prozesse in einer Zelle oder einem Organismus ist die Regulation der Genexpression. Dazu muss in unterschiedlichen Zelltypen ein jeweils spezifischer Teil der Erbinformation zunächst in mRNA umgeschrieben, prozessiert, ins Zytoplasma exportiert und in Proteine übersetzt werden. Diesen Prozessen stehen natürliche Mechanismen der Genregulation gegenüber. Zu hohe Akkumulation von mRNA kann zu verminderter Genexpression führen. Eine solche Gen-Inaktivierung wurde in transgenen Pflanzen (Napoli *et al.* 1990), Pilzen (Romano und Macino 1992), *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998), Insekten (Misquitta und Paterson 1999), Mäusen (McCaffrey *et al.* 2002) und humanen Zellkulturen (Elbashir *et al.* 2001) gefunden und untersucht.

Mechanistische Untersuchungen der Gen-Inaktivierung von Transgenen zeigten, dass die Regulation auf verschiedenen Ebenen des genetischen Informationsflusses erfolgen kann. Daher wird zwischen transkriptioneller (TGS) und post-transkriptioneller (PTGS) Gen-Inaktivierung unterschieden (Stam *et al.* 1997).

A.2.1 Transkriptionelle Gen-Inaktivierung

Als transkriptionelle Gen-Inaktivierung (TGS, *transcriptional gene silencing*) bezeichnet man die Repression der Transkription. TGS wurde häufig mit dem Integrationsort von Transgenen assoziiert. Doppelsträngige RNAs mit Sequenzidentität zur Promotorregion eines Reportergens können TGS in *N. tabacum* und *A. thaliana* auslösen (Mette *et al.* 2000). TGS in Pflanzen ist verbunden mit erhöhter DNA Methylierung an den Promotoren der stillgelegten Gene und kann meiotisch vererbbar sein (Park *et al.* 1996, Assaad *et al.* 1993).

A.2.2. Post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung

Von post-transkriptioneller Gen-Inaktivierung (PTGS, *post transcriptional gene silencing*) spricht man, wenn die mRNA eines Gens trotz Aufrechterhaltung der Transkription nicht akkumuliert, sondern abgebaut wird. PTGS wird in Pflanzen in jeder Generation neu etabliert und nimmt im Laufe der Pflanzenentwicklung zu. Die Gen-Inaktivierung kann systemisch erfolgen (Voinnet und Baulcombe 1997). Sogenannte kleine (21-24 nt) interferierende RNAs (*small interfering*, siRNAs), die Homologie zur transkribierten Sequenz des stillgelegten Gens aufweisen, sind beim PTGS nachweisbar. Sie liegen sowohl in *sense* als auch in *antisense*

Orientierung vor, was eine Entstehung über doppelsträngige RNA als Zwischenprodukt wahrscheinlich macht (Hamilton und Baulcombe 1999).

Historischer Rückblick

Zweck der gentechnischen Modifikation von Pflanzen ist die zielgerichtete Veränderung von bestimmten Eigenschaften. Eine mögliche Strategie ist die Erhöhung der Transkriptmengen bestimmter Gene, um gewünschte Genprodukte in den Pflanzen anzureichern.

Diese Strategie führt nicht notwendigerweise zum gewünschten Erfolg. Im Jahr 1990 wurde der Effekt der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung zuerst in transgenen Petunien beschrieben, die Ursache dieses Effekts wurde allerdings noch nicht verstanden. Durch die Überexpression von Chalconsynthase (*Chs*), eines Schlüsselenzyms der Anthocyan-Biosynthese, sollten transgene Petunien mit stärker purpur gefärbten Blüten erzeugt werden. Stattdessen hatten viele Pflanzen mit *Chs-sense* Konstrukten weiße Blüten, ein Phänomen, das als „Cosuppression“ beschrieben wurde. Sowohl die Expression des endogenen Gens als auch die des Transgens war vermindert. Auch der Einfluss von *Chs-antisense* Genkonstrukten auf die Expression des endogenen *Chs* Gens wurde untersucht. Zwischen der Zahl der eingeführten *Chs-antisense* Genkopien und der Menge der vorhandenen *antisense* RNA konnte keine Korrelation festgestellt werden. Diese Studie ergab, dass Transformanten mit vergleichbaren Mengen an *antisense* RNA unterschiedliche Muster der Blütenfärbung zeigten, was als Hinweis auf eine variable Reduktion der *Chs*-Expression gedeutet werden kann (Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990). Spätere umfangreichere Untersuchungen zum Muster der Blütenfärbung in Petunien legten eine Korrelation zwischen der Anzahl der Transgene mit *Chs* in *antisense* Orientierung und der Stärke der *antisense* Unterdrückung nahe. Eine vergleichbare Korrelationen wurden auch zwischen der Anzahl der Transgene mit *Chs* in *sense* Orientierung und der Gen-Inaktivierung gefunden (Jorgensen *et al.* 1996). Wesentlich stärkere Gen-Inaktivierung wurde für *Chs*-Einzelkopie-Transgene in *antisense* sowie *inverted repeat* (IR) Orientierung im Vergleich zu *Chs*-Einzelkopie-*sense* Transgene gefunden (van Blokland *et al.* 1997, Stam *et al.* 1997, Metzlauff *et al.* 1997).

Die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung kann nicht nur endogene Pflanzengene betreffen. Auch Transkripte für die Expression rekombinanter Gene können ihr unterliegen. In einer Untersuchung von Holtorf *et al.* (1995) wurde ein Gen für β -Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors in *A. thaliana* eingebracht. Messungen der GUS Enzymaktivität ergaben bis zu 1000-fache Unterschiede zwischen unabhängigen transgenen Linien. In diesen und vergleichbaren Untersuchungen war die

verringerte oder vollständig unterdrückte Expression eines Transgens (bzw. des endogenen Gens) nicht mit einem Verlust des Transgens oder einer Veränderung der DNA-Sequenz der betroffenen Gene korreliert.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurden Strategien entwickelt, um in transgenen Pflanzen die Expression bestimmter Gene durch gezielte Bildung doppelsträngiger RNA mit Homologie zum Gentranskript zu inhibieren. Dies erfolgt z.B. durch gleichzeitige Transkription von *sense* und *antisense* Transgenen oder, besonders effektiv, durch Transkription von *inverted repeat* (IR) Konstrukten (Waterhouse *et al.* 1998).

Virusabwehr als natürliche Funktion

Eine biologische Rolle und somit natürliche Funktion der Gen-Inaktivierung besteht in der Abwehr pathogener Elemente (Waterhouse *et al.* 2001). Von RNA-Viren befallene Pflanzen können nach einer Phase der Sensitivität Resistenz gegen die betreffenden Viren zeigen. Transgene, die Sequenzen mit Homologie zu den RNA-Viren aufweisen, können ebenfalls Resistenz verleihen. Post-transkriptionell inaktivierte Transgene können somit Resistenz gegen Viren vermitteln. Andererseits kann durch die Infektion mit einem RNA-Virus mit Homologie zur transkribierten Sequenz die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung eines Transgens oder endogenen Gens ausgelöst werden (Baulcombe 1996). Dieses Phänomen wird als „Virus-induziertes Gen-Silencing“ (VIGS) bezeichnet. VIGS erfolgt aber nur, wenn das Virus Sequenzen mit Homologie zu Exons des Zielgens besitzt. Der Abbau der mRNA erfolgt im Zytoplasma. Die Initiation der Gen-Inaktivierung könnte durch doppelsträngige virale RNA, die im Zuge der Virus-Replikation gebildet wird, erfolgen (Hamilton und Baulcombe 1999). Die Entdeckung viraler Proteine, die als Suppressoren der Gen-Inaktivierung wirken, legt eine Interpretation von PTGS als Mechanismus zur Abwehr von Viren nahe. Virale Suppressoren hemmen den post-transkriptionellen Abbau von Virus-RNA (und auch von mRNA) und können die pflanzliche Abwehr neutralisieren (Waterhouse *et al.* 2001). Verschiedene Klassen viraler Suppressoren [z. B. HC-Pro aus PVY (Potato Virus Y) und p19 aus TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus)] unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise und stellen somit wertvolle „Instrumente“ zur Untersuchung der Mechanismen der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung dar.

Systemische Ausbreitung von post-transkriptioneller Gen-Inaktivierung

Transgene Pflanzen mit *GFP* unter der Kontrolle eines starken Promotors als Reportergen eignen sich hervorragend für die mechanistische Untersuchung der Gen-Inaktivierung, da die Genexpression anhand der GFP-Fluoreszenz leicht optisch verfolgt werden kann. In *N. benthamiana*-Linien, die ein GFP-Transgen tragen, kann mittels transientem *Agrobacterium tumefaciens*-vermitteltem Transfer von zusätzlichen *GFP*-Kopien eine *GFP*-Gen-Inaktivierung im Blattgewebe ausgelöst werden. Die Gen-Inaktivierung wird zuerst an den Rändern der infiltrierten Blattbereiche beobachtet und breitet sich zunächst nicht weiter aus. Kurze Zeit später kann eine deutliche Gen-Inaktivierung in den obersten Blättern der Pflanze beobachtet werden. Diese Experimente weisen darauf hin, dass sich ein Signal für die Gen-Inaktivierung systemisch vom Ort der Infiltration und damit Initiation der Gen-Inaktivierung ausbreitet. Mit zunehmendem Alter der Pflanze werden immer größere Teile der Pflanze betroffen (Voinnet und Baulcombe 1997). Neuere Untersuchungen in *A. thaliana* und *N. tabaccum* wiesen darauf, dass endogene RNA-abhängige RNA Polymerasen (*RNA-directed RNA polymerases*, RdRPs) für die Signalamplifikation notwendig sind. Man unterscheidet zwei Arten von systemischer Ausbreitung. Die Signalübertragung über die „Kurzstrecke“ von 10 bis 15 Zellen erfolgt über Zell-zu-Zell Transport und benötigt die Aktivität von RDR6. Hier werden 21 Nukleotid-siRNAs als Signal angenommen. Das Signal über die „Langstrecke“ erstreckt sich über das Phloem in der gesamten Pflanze, benötigt die Aktivität von RDR2 und könnte über 24 Nukleotid-siRNAs vermittelt werden (Dunoyer *et al.* 2007, Vaistij *et al.* 2002).

A.2.3 Mechanismus der RNA-abhängigen Gen-Inaktivierung

Zentrale Rolle doppelsträngiger RNA

Die der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden allerdings erst ab Mitte der 1990er Jahre durch die Untersuchung der RNA-Interferenz (RNAi) in *Caenorhabditis elegans* aufgedeckt. Guo und Kemphues (1995) fanden, dass in *C. elegans* nicht nur die Injektion von *antisense* RNA (im Bezug auf das Ziel-Transkript), sondern auch von *sense* mRNA oder einer Mischung aus *sense* und *antisense* mRNA die Expression eines endogenen Gens unterdrückt werden kann. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass insbesondere die doppelsträngige RNA die Expression eines Gens sehr effizient vermindern kann (Fire *et al.* 1998). Inzwischen wurde bestätigt, dass

dsRNA die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung nicht nur in *C. elegans* (hier RNA-Interferenz genannt), sondern in nahezu allen untersuchten eukaryotischen Organismen mit Ausnahme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hervorrufen kann (Agrawal *et al.*, 2003).

Transkriptmengen-abhängiges PTGS

Als eine mögliche Erklärung für die Auslösung der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung wird ein Schwellenwert-Modell („*threshold-mode*“) diskutiert. Dabei wird angenommen, dass bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration einer mRNA PTGS ausgelöst wird (Vaucheret *et al.* 1998, Dehio und Schell 1994). In zahlreichen Studien wurden Hinweise gefunden, dass eine erhöhte Transkriptmenge als Auslöser von PTGS dienen kann. Bei der Expression eines Chalconsynthase-Transgens (*Chs*) in Petunie zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Zahl der integrierten Kopien des Transgens und dessen Expression (Jorgensen *et al.* 1996). Für ein β -Glucuronidase-Reporter-gen (*GUS*) zeigte sich in *N. tabacum* bis zu einer bestimmten Kopienzahl des *GUS*-Gens eine positive, darüber hinaus eine negative Korrelation der *GUS*-Kopienzahl zur *GUS* Expression (Hobbs *et al.* 1993).

Eine endgültige Bestätigung des Schwellenwert-Modells brachte die Studie von Schubert *et al.* (2004) in *A. thaliana*. PTGS kann ausgelöst werden, wenn die Transkriptmenge einen bestimmten Gen-spezifischen Schwellenwert überschreitet. Da für mehrere Kopien eines Genkonstrukts die resultierende primäre Transkriptmenge direkt proportional zur Kopienzahl ist, wird nach diesem Modell PTGS umso wahrscheinlicher, je höher die Anzahl integrierter Reporter-genkopien ist. Durch Kreuzen verschiedener transgener Linien, die *GFP*-, *SPT*-, oder *GUS*-Reporter-gene unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors enthielten, wurden Pflanzen mit unterschiedlichen Zahlen an Reporter-genkopien erzeugt. Eine stabile und hohe Expression des jeweiligen Reporter-gens war nur bis zu einer bestimmten Kopienzahl möglich (zwei für *GUS*, vier für *GFP* und sechs für *SPT*).

Es konnte von Schubert *et al.* (2004) kein Hinweis auf eine Abhängigkeit der Expression vom Insertionsort einer T-DNA gefunden werden. In 132 transgenen *A. thaliana*-Linien war bis zu einer bestimmten Kopienzahl die Transgenexpression über alle analysierten Generationen hinweg stabil. Die beobachtete Variabilität in den Expressionsniveaus in unabhängigen transgenen Linien, die vom gleichen Konstrukt abgeleitet sind, konnte auf PTGS zurückgeführt werden (Butaye *et al.* 2004, Lechtenberg 2003, Schubert *et al.* 2004).

Die RdRPs in *A. thaliana*, *N. crassa* und in *C. elegans* bilden kleine Genfamilien und weisen ähnliche Sequenzmotive wie die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen auf (Iyer *et al.* 2003). In *A. thaliana* wurden sechs RdRP- codierende Gene identifiziert (The Chromatin Database <http://www.chromdb.org/>). Diese wurden als *RDR1* bis *RDR6* (*AtRDR1* bis *AtRDR6*: The *Arabidopsis* Information Resource <http://www.arabidopsis.org/>) bezeichnet. Das *RDR1*-Protein wird mit der Kontrolle der Virus- und Viroid-Akkumulation in Verbindung gebracht (Wassenegger und Krczal 2006). Die *RDR2* ist an Prozessen im Zellkern beteiligt und für die *de novo* DNA-Methylierung bestimmter Sequenzen via 24 nt siRNAs essentiell. Eine weitere wichtige Funktion hat die *RDR2* bei Produktion oder Empfang des mobilen Signals für die systemische Ausbreitung der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung (Dunoyer *et al.* 2007, Vaistij *et al.* 2002). *RDR3*, *RDR4* und *RDR5* besitzen hohe Sequenzähnlichkeiten und sind auf Chromosom 2 von *A. thaliana* als Gencluster angeordnet. Ihre Funktion ist bisher noch unbekannt. Mikroarray-Daten zeigen, dass die *RDR5* besonders stark im Samen exprimiert wird (Schmid *et al.* 2005, <https://www.genevestigator.rthz.ch/>, Zimmermann *et al.* 2004). Die *RDR6* spielt die wichtigste Rolle im PTGS und VIGS. Sie übernimmt im Verbund mit SGS3 die Synthese des komplementären RNA-Strangs bei der Bildung von *transacting* siRNAs (tasiRNAs). Die entstandene doppelsträngige RNA wird dann durch DCL4 in 21 nt lange tasiRNA (transagierende siRNA) gespalten. Diese regulieren die Expression von endogenen mRNAs durch Spaltung der Ziel-mRNA (Vazquez *et al.* 2004, Peragine *et al.* 2004).

A.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Mechanismen der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung die Expression von rekombinanten Proteinen im Endosperm der Gerste begrenzen. Dies ist von unmittelbarer Relevanz, da eine denkbare Strategie zur Erhöhung der Expression von rekombinanten Proteinen eine Erhöhung der Zahl der integrierten Expressionskassetten wäre. Das mögliche Einsetzen der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung würde dieser Absicht aber zuwiderlaufen.

Parallel wurden in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* grundlegende Arbeiten zum Mechanismus der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung durchgeführt. Unter Nutzung der für diese Pflanze zugänglichen genetischen Ressourcen wurden die Rollen einzelner RNA-abhängiger RNA Polymerasen analysiert. Die Ergebnisse könnten neue Strategien zur Umgehung der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung bei der Expression rekombinanter Proteine in Kulturpflanzen aufzeigen.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Primer und Kits

Die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Eppendorf (Wessling-Berzdorf), GE Healthcare (München), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen. Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook und Russell 2001) in bidest. H₂O angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min; 121°C; 2 bar). Die meisten der eingesetzten Enzyme kamen von Fermentas (St. Leon Rot), DNA Polymerasen für die PCR wurden von der Promega GmbH (Mannheim) bezogen. Primer zur Amplifikation von spezifischen DNA-Bereichen sowie für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden stammten von der Firma Metabion International AG (Martinsried). Kits für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien sowie von Gesamt-DNA, Gesamt-RNA und „kleinen RNAs“ (siRNA) aus Pflanzen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Für „nicht-radioaktive“ Southern-Analysen mit dem Digoxigenin (DIG)-Markierungs- und Detektionssystem wurden die Reagenzien *DNA Molecular Weight Marker III*, *Nylon Membranes positively charged*, *DIG Easy Hyb Granules*, *PCR DIG Probe Synthesis Kit*, *DIG Wash and Buffer Set*, *Anti-Digoxigenin Fab Fragment*, und *CSPD ready to use* der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) genutzt.

B.1.2 Puffer und Lösungen

Im Anhang G (Tab. G-1) sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit mehr als einer Komponente aufgeführt. Die Zusammensetzung einfacher Lösungen ist den jeweiligen Beschreibungen der Methoden zu entnehmen. Die Komponenten der kommerziell erhältlichen Puffer und Lösungen sind den Angaben der Hersteller zu entnehmen.

B.1.3 Medien und Antibiotika

Die Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien richtete sich nach Sambrook und Russel (2001). Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert (20 min; 121°C; 2 bar). Hitzeempfindliche Komponenten wurden als Stammlösung in bidest. H₂O angesetzt, steril filtriert (z. B. Maltose durch Corning 150 ml und 500 ml Bottle Top Vakuum Filter; 0,22 µm

und Antibiotika durch Spritzenfilter CA-Membran, 0,2 µm, beide Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt) und erst nach dem Abkühlen der Medien auf unter 50°C zugegeben.

Medien

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Tabelle B-1 zusammengefasst. Im Falle der Verwendung als Festmedium enthielten die Medien 0,7 % (w/v) Bacto™-Agar (für CPY-Medium), 0,8 % (w/v) Bacto™-Agar (für GM-Medium) und 1,5 % (w/v) Bacto™-Agar (für LB-Medium).

Tabelle B-1: Kulturmedien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien.

Medium/ Antibiotika	Konzentrationen	Komponenten	Organismus
CPY-Medium	0,1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) 2,0 mM	Hefeextrakt Pepton Saccharose MgSO ₄ x 7 H ₂ O*	<i>A. tumefaciens</i>
LB-Medium	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1,0 % (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl	<i>E. coli</i>
SOC-Medium	2,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 10,0 mM 2,5 mM 1,0 mM 1,0 mM 2,0 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCL MgCl ₂ * MgSO ₄ * Glucose*	<i>A. tumefaciens</i>
Kanamycin ⁵⁰	50 mg/l		<i>E. coli</i>
Spectinomycin ⁵⁰	50 mg/l		<i>A. tumefaciens</i>
Tetracyclin ⁵	5 mg/l		<i>A. tumefaciens</i>

*Zusatz nach dem Autoklavieren

Tabelle B-2: Kulturmedium und Antibiotika für die *in vitro* Kultur von *Arabidopsis thaliana*.

Medium	Konzentrationen	Komponenten	Antibiotika
GM-Medium (pH 5,7)	0,21 % (w/v) 1,0 % (w/v) 5,0 ml 10,0 ml 0,05 % (w/v) 40 mg/l 5,25 mg/l	Murashige & Skoog (Fertigsbstanz) Saccharose Fe-EDTA B5-Vitamine MES	Kanamycin ⁴⁰ Sulfadiazin ^{5,25}

Medien und Antibiotika zur *in vitro* Kultur von Gerste

Die Medien für die embryogene Pollenkultur, Agrobakterien-vermittelte Transformation und Regeneration von Gerste (cv. Igri) sind in Tabelle B-3 beschrieben (Kumlehn *et al.* 2006).

Tabelle B-3: Medien für die Agrobakterien-vermittelte Pollentransformation von Gerste.

Komponenten [mg/l]	KBP	CK	Ast25HT	S100HT	K4NB50HT
<u>Makroelemente</u>					
NH ₄ NO ₃	80 (1 mM)	80 (1 mM)	80 (1 mM)	80 (1 mM)	320 (4 mM)
KNO ₃	2,022 (20 mM)	2,022 (20 mM)	2,022 (20 mM)	2,022 (20 mM)	3,640 (36 mM)
KH ₂ PO ₄	340 (2.5 mM)	340 (2.5 mM)	340 (2.5 mM)	340 (2.5 mM)	340 (2.5 mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	441 (3 mM)	441 (3 mM)	1.470 (10 mM)	441 (3 mM)	441 (3 mM)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246 (1 mM)	246 (1 mM)	246 (1 mM)	246 (1 mM)	246 (1 mM)
NaFeEDTA	27.5 (75 µM)	27.5 (75 µM)	27.5 (75 µM)	27.5 (75 µM)	27.5 (75 µM)
<u>Mikroelemente</u>					
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11.2 (50 µM)	11.2 (50 µM)	11.2 (50 µM)	11.2 (50 µM)	11.2 (50 µM)
H ₃ BO ₃	3.1 (50 µM)	3.1 (50 µM)	3.1 (50 µM)	3.1 (50 µM)	3.1 (50 µM)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.2 (25 µM)	7.2 (25 µM)	7.2 (25 µM)	7.2 (25 µM)	7.2 (25 µM)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.12 (0.5 µM)	0.12 (0.5 µM)	0.12 (0.5 µM)	0.12 (0.5 µM)	0.12 (0.5 µM)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 (0.1 µM)	0.025 (0.1 µM)	0.025 (0.1 µM)	0.025 (0.1 µM)	1.25 (5 µM)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.024 (0.1 µM)	0.024 (0.1 µM)	0.024 (0.1 µM)	0.024 (0.1 µM)	0.024 (0.1 µM)
KI	0.17 (1 µM)	0.17 (1 µM)	0.17 (1 µM)	0.17 (1 µM)	0.17 (1 µM)
<u>Organika</u>					
	(Sigma K-3129)	(Sigma K-3129)	(Sigma K-3129)	(Sigma K-3129)	
Retinol	0.01	0.01	0.01	0.01	-
Thiamin·HCl	1.0	1.0	1.0	1.0	10.0
Nicotinsäure	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Riboflavin	0.2	0.2	0.2	0.2	-
Ca-Pantothenat	1.0	1.0	1.0	1.0	-
Folsäure	0.4	0.4	0.4	0.4	-
Pyridoxin·HCl	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Kobalamin	0.02	0.02	0.02	0.02	-
Ascorbinsäure	2.0	2.0	2.0	2.0	-
Calciferol	0.01	0.01	0.01	0.01	-
Biotin	0.01	0.01	0.01	0.01	-
Cholinchlorid	1.0	1.0	1.0	1.0	-
p-Aminobenzoesäure	0.02	0.02	0.02	0.02	-
myo-inositol	100	100	100	100	-
Glutamin	438 (3mM)	-	146 (1 mM)	-	146 (1 mM)
Maltose·H ₂ O	90,000 (0.25M)	90,000 (0.25 M)	90,000 (0.25 M)	90,000 (0.25 M)	36,000 (0.1 M)
BAP	(4 µM)	(2 µM)	(2 µM)	(1 µM)	(1 µM)
2,4-D	-	-	(10 µM)	-	-
Acetosyringone*	-	(0.5 mM)	(0.5 mM)	-	-
Timentin	-	-	200	200	200
Hygromycin	-	-	(25 µM)	(100 µM)	(50 µM)
Phytigel (SigmaP8169)	-	-	-	-	4,000
pH	5.9	5.9	5.0	5.5	5.9
KHP*	-	50 mM pH 5.9	25 mM pH 5.0	-	-
MES*	-	10 mM pH 5.9	10 mM pH 5.0	10 mM pH 5.5	-

BAP, 6-Benzylaminopurin; 2,4-D, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure

*Acetosyringone-Stammlösung 1 M in DMSO

*KHP = Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, 1 M Stammlösungen mit pH wie angegeben

*MES = morpholinoethanschweflige Säure, 1 M Stammlösungen mit pH wie angegeben

B.1.4 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana

Alle verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen entstammten der Akzession Col-0.

Mutante *rdr2-1* (SAIL_1277_H08, Xie *et al.* 2004) wurde von Marjori Matzke (Gregor Mendel Institut, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt. Weitere T-DNA Insertions- und Punktmutanten wurden entweder von GABI-Kat (*rdr2-gk*, *rdr5-gk*) oder vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (Nottingham, Großbritannien) bezogen. Eine Zusammenstellung aller verwendeten Mutanten findet sich im Ergebnis-Teil (Tab. C-1).

Samen der transgenen Linie GUS 2xr 126 wurden von Renate Schmidt (IPK, Arbeitsgruppe Genomplastizität, Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Die Linie enthält im pericentromeren Bereich von Chromosom 1 eine einzelne Insertion eines T-DNA Konstrukts mit zwei Kopien eines pro35S-GUS-OCster Reportergens (Forsbach *et al.* 2003, Schubert *et al.* 2004).

Anzucht von *A. thaliana*-Pflanzen

A. thaliana Pflanzen wurden in Kulturräumen oder Klimaschränken (Percival Scientific Inc., CLF Laborgeräte, Emersacker) mit geregelter Beleuchtungsdauer und Temperatur unter Langtag- (16 Stunden Licht- und 8 Stunden Dunkelphase) oder Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht- und 16 Stunden Dunkelphase) bei 21°C auf Kultursubstrat (Substrat 2, Klasmann-Deilmann GmbH, Geste-Groß Hesepe) oder Gewächshauserde kultiviert. Zur Synchronisierung der Keimung wurden Samen auf Erde oder Kulturmedium (GM-Medium) vor der Überführung in Klimakammern oder Klimaschränke für 48 h bei 4°C in Dunkelheit stratifiziert.

Die Sterilisation von *A. thaliana* Samen erfolgte in 2,2 ml Reaktionsgefäßen. 50 mg Samen wurden 3 min in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol und anschließend 15 min in 1 ml 4 % (v/v) Natriumhypochloridlösung geschwenkt. Es folgten ein Waschschrift von 1 min mit 1 ml sterilem bidest. H₂O sowie drei Waschschrift von 5 min mit 1 ml sterilem bidest. H₂O. Die Samen wurden steril in 0,1 % (w/v) Agarose aufgenommen und unter sterilen Bedingungen auf GM-Medium (gegebenenfalls mit einem Antibiotikum zur Selektion, Tab. B-2) verteilt.

Kreuzung transgener *A. thaliana* Linien

Die gezielte Kreuzung transgener *A. thaliana* Linien erfolgte mittels Emaskulierung der Mutterpflanzen, wie in Koornneef *et al.* (2006) beschrieben. Die Befruchtung mit dem Pollen des Kreuzungspartners erfolgte am gleichen Tag unmittelbar nach dem Entfernen der Antheren.

Hordeum vulgare

Für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wurden unreife Gerstenpollen im späten Mikrosporen- und frühen zweizelligen Entwicklungsstadium aus zweizeiliger Wintergerste (*Hordeum vulgare* L.) der Sorte Igri (Saatzucht Ackermann, Irlbach) wie von Kumlehn *et al.* (2006) beschrieben isoliert und kultiviert.

B.1.5 Verwendetes T-DNA-Konstrukt in *H. vulgare*

Das T-DNA-Konstrukt pSB262 (Abb. C-22) wurde in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie im IPK, Gatersleben, von Sylvia Broeders hergestellt (persönliche Mitteilung). Es basiert auf dem binären Vektor p6U (DNA Cloning Service, Hamburg), der Replikationsursprünge zur Propagierung in *E. coli* und *A. tumefaciens* besitzt.

Als selektierbarer Marker für die Erzeugung transgener Pflanzen dient ein Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (*HPT*, Hagio *et al.* 1995, Manoharan und Dahleen 2002) unter der Kontrolle des Ubiquitin1 Promoters mit einem 5'-UTR aus Mais (Christensen und Quail 1996). Auf die codierende Sequenz des *HPT*-Gens folgt der CaMV 35S-Terminator. Als Reportergen wurde die codierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins sGFP (S65T)-KDEL (Chiu *et al.* 1996, Pang *et al.* 1996) ausgewählt. Das Reportergen (sGFP) befindet sich unter der Kontrolle des Endosperm-spezifischen Promoters des alpha-Gliadin (α G) Gens aus Weizen (Vickers *et al.* 2006) und wird von der Polyadenylierungssequenz des Nopalin-Synthasegens aus *A. tumefaciens* (Gan und Amasino 1995) terminiert.

B.2. Methoden

B.2.1 Kultur von *Hordeum vulgare*

Zur Anzucht von nicht-transgenen Gerstenpflanzen wurden das Substrat „Spezialmischung“ (Klasmann-Deilmann GmbH, Geste-Groß Hesepe) in Pflanztöpfen mit 6 cm Durchmesser (Hermann Meyer KG, Rellingen) verwendet. Die Samenkeimung erfolgte für zwei Wochen in Klimakammern (14/12°C Tag/Nacht, 16 h Licht). Anschließend erfolgte eine Vernalisation der Gerstenpflanzen für acht Wochen (2°C, 9 h Licht). Die weitere Kultivierung der Jungpflanzen erfolgte in Pflanztöpfen mit 18 cm Durchmesser (Hermann Meyer KG, Rellingen) im Gewächshaus [18/14°C Tag/Nacht, 16 h Licht, 200 W/m² (SON-T-Agro Lampen, Philips, Hamburg)]. Die Abreife der Gerstenpflanzen erfolgte ebenfalls im Gewächshaus, aber bei erhöhten Temperaturen [21/19°C Tag/Nacht, 200 W/m² (SON-T-Agro Lampen, Philips, Hamburg)].

Die Aussaat, Anzucht und Kultur von transgenen Gerstenpflanzen *in vitro* erfolgte auf K4NB (vgl. B.2.4 und Tab. B-3) mit Hygromycin (Selektionsantibiotikum) und Timentin (antibakterielles Antibiotikum mit breitem Wirkungsspektrum) bei 17°C und 16 h Licht pro Tag ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht). Aus Samen gezogene, wie auch aus dem Kallus regenerierte transgene Gerstenpflanzen wurden in Pflanztöpfe mit \varnothing 6 cm (Hermann Meyer KG, Rellingen) mit Substrat „Spezialmischung“ (Klasmann-Deilmann GmbH, Geste-Groß Hesepe) umgesetzt und unter den gleichen Anzucht-Bedingungen wie nicht-transgene Gerstenpflanzen weiter kultiviert.

Düngung und eventuelle Schädlingsbekämpfung erfolgten nach Bedarf.

B.2.2 Herstellung transgener Gerste

Isolierung und Kultivierung unreifer Gerstenpollen (nach Kumlehn *et al.* 2006)

Gerstenähren zur Isolierung unreifer Gerstenpollen im späten Mikrosporen- und frühen zweizelligen Entwicklungsstadium wurden geerntet, wenn die Grannenspitzen am Übergang von der Blattspreite zur Blattscheide gerade sichtbar waren, was ca. 5 Monate nach der Keimung der Pflanzen der Fall war. Die Oberfläche der die Ähren noch vollständig umhüllenden Blattscheiden wurde durch Besprühen mit 70% (v/v) Ethanol sterilisiert. Die Ähren wurden dann unter sterilen Bedingungen aus den Hüllen entfernt und mit einer Pinzette von den Grannen befreit. Die deutlich schwächer ausgebildeten oberen und unteren Blütchen wurden ebenfalls entfernt. Zur Unterbrechung der Pollenentwicklung wurden die Ähren einer Kältevorbehandlung unterzogen. Bis zu fünf Ähren wurden in einer mit Parafilm versiegelten Petrischale auf mit sterilem bidest. H₂O befeuchtetem Filterpapier (\varnothing 70 mm, Filter Discs Grade 3 hw; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) für drei bis fünf Wochen bei 4°C inkubiert.

Die Isolierung der unreifen Pollen erfolgte möglichst zügig unter permanenter Kühlung auf Eis, um eine hohe Vitalität zu gewährleisten. Zehn bis 15 vorbehandelte Ähren wurden in circa 1 cm lange Abschnitte geschnitten und mit 20 ml 0,4 M Mannitol (Tab. B-4) in einem Mixer [Waring Blendor (Eberbach Corp., Ann Arbor; MI, USA)] auf niedrigster Stufe zweimal für je 10 Sekunden zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein Nylonsieb (Wilson, Nottingham, UK) mit einem Porendurchmesser von 100 μm in eine Magentadose filtriert. Gewebereste wurden durch Spülen mit weiteren 10 ml 0,4 M Mannitol aus dem Mixer auf das Nylonsieb gebracht. Die Ährenreste wurden mit einer Pinzette leicht ausgedrückt, in den Mixer zurückgegeben, noch einmal mit 10 ml 0,4 M Mannitol versetzt und auf niedrigster Stufe zweimal je 5 Sekunden weiter zerkleinert. Die Suspension wurde durch das Nylonsieb mit 100 μm Porendurchmesser filtriert. Verbliebene Gewebereste wurden mit weiteren 10 ml 0,4 M Mannitol aus dem Mixer gespült und auf das Nylonsieb verbracht, wo die Ährenreste ein letztes Mal leicht ausgedrückt wurden.

Die Pollensuspension wurde mit einer 10 ml Einwegpipette in ein steriles 50 ml Falconröhrchen überführt. Reste in der Magentadose wurden mit 5 ml 0,4 M Mannitol aufgenommen und ebenfalls in das 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Pollensuspension wurde für zehn Minuten bei 100x g und 4°C zentrifugiert. Der grünliche Überstand wurde mit einer 10 ml Einwegpipette abgenommen und verworfen, das Sediment in 5 ml 0,55 M Maltose I (Tab. B-4) resuspendiert und mit einer Weithalspipette in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Cellstar® Polystyrol; 12 ml von Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. Die Mikrosporensuspension im Zentrifugenglas wurde unter Aufsetzen der Pipette (Finnpipette, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) in der Mitte des Flüssigkeitsspiegels vorsichtig mit 1.5 ml 0,4 M Mannitol überschichtet. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 100x g und 4°C wurden die in der Interphase der beiden Schichten flotierenden Pollen unter vorsichtigem Drehen des Röhrchens mit einer 5 ml Enghalspipette möglichst vollständig abgenommen. Die Pollensuspension wurde in einem 50-ml-Falconröhrchen mit 0,4 M Mannitol auf 20 ml aufgefüllt und gründlich durchmischt. 20 µl wurden in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Hämacytometer 0,0625 mm² und 0,2 mm Schichtdicke von Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) transferiert. Die Populationsdichte wurde durch Auszählen der Pollen bestimmt. Basierend auf dieser Zählung wurde Stammsuspension mit 0,4 M Mannitol auf eine Konzentration von ca. 400.000 Pollen pro ml Medium eingestellt. Die Suspension wurde für zehn Minuten bei 100 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 10 ml Einwegpipette abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit KBP-Medium nach der oben bestimmten Populationsdichte zu einer Pollen-Konzentration von ca. 250.000 Pollen pro ml Medium aufgenommen. Unter ständigem Resuspendieren wurden Volumina von je 1 ml KBP-Medium mit Pollen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm verteilt. Die Schalen wurden mit Parafilm versiegelt und bis zur Co-Kultur mit Agrobakterien für sieben bis acht Tage im Dunkelschrank bei 26°C inkubiert.

Tabelle B-4: Lösungen zur Isolierung von Gerstenmikrosporen.

Lösung	Komponenten	Hinweise
Isolierungslösung	0,4 M Mannitol	steril filtriert, vorgekühlt auf 4°C
Dichtegradientenzentrifugationslsg.	0,55 M Maltose I	steril filtriert, vorgekühlt auf 4°C

B.2.3 Bakterienstämme und deren Transformation

Escherichia coli

Die Transformation von *E. coli* DH5 α erfolgte mittels der CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.* 1989). Die Anzucht von transformierten *E. coli*-Stämmen für Plasmid-Präparationen erfolgte ausgehend von Einzelkolonien in LB-Medium (Tab. B-1) supplementiert mit entsprechenden Antibiotika (vgl. Tab. B-1) bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm.

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mittels des *Qiaprep Spin Miniprep* Kit und des Qiagen *Plasmid Midi* Kit der Firma Qiagen entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mit T-DNA Konstrukten

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in embryogenen Pollenkulturen von Gerste wurde der hypervirulente Stamm LBA4404 (pSB1) verwendet, der die Virulenzgene *VirB*, *VirC1* und *VirG* (Komari *et al.* 1996) in zusätzlichen Kopien beinhaltet. Die Anzucht erfolgte in CPY Medium mit Spectinomycin (50 μ g/ml) und Tetracyclin (5 μ g/ml) bei 28°C.

Die Transformation kompetenter *A. tumefaciens* LBA4404 (pSB1) (Sambrook *et al.* 1989) mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation (25 μ F; 2,5 kV und 200 Ohm; Gene Pulser[®]II, Bio-Rad Laboratories GmbH München). Der Transformationsansatz (60 μ l) wurde anschließend mit 800 μ l SOC-Medium versetzt und 1 h bei 28°C inkubiert. Danach wurden je 100 μ l Flüssigkultur auf einer LB-Platte mit Antibiotika [Spectinomycin (100 μ g/ml) und Tetracyclin (10 μ g/ml)] verteilt und für zwei Tage bei 28°C kultiviert. Resistente Kolonien wurden aufgenommen und weiter kultiviert.

Zur Überprüfung des intakten Transfers der binären Vektoren wurde Plasmid-DNA aus den transformierten *A. tumefaciens*-Stämmen isoliert und durch Restriktionsspaltung geprüft. Aus je 2 ml Flüssigkultur wurde Plasmid-DNA mittels des *Qiaprep Spin Miniprep* Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgte die Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I (Fermentas, 10 U) und die Restriktionsfragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert. War das erhaltene Fragmentmuster identisch mit dem des ursprünglichen Konstrukts, so wurde von einem intakten Transfer des Plasmids ausgegangen.

Zur Anzucht von *A. tumefaciens*-Kulturen für die Transformation von Pollenkulturen wurden je 10 ml CPY-Medium mit Spectinomycin (50 μ g/ml) und Tetracyclin (5 μ g/ml) (vgl. B.2.4) ausgehend von einer frisch angezogenen Einzelkolonie angeimpft und für 24 h bei 28°C unter Schütteln bei 200 rpm (Rotationen pro Minute) inkubiert. Die Flüssigkultur wurde auf zwei Kulturröhrchen (Cellstar[®] Polystyrol; 12 ml Zellkulturröhrchen, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) verteilt und bei 4.000 rpm und 20°C für 10 min zentrifugiert

(Eppendorf Zentrifuge 5810R; Wesseling-Berzdorf). Nach Abnahme des Überstands wurde das Sediment in jeweils 2,5 ml CPY-Medium ohne Antibiotika resuspendiert. Die Teilvolumina wurden zusammengeführt. Die OD₅₅₀ dieser Suspension wurde im Photometer der Firma Pharmacia bestimmt und danach durch Verdünnen mit CPY-Medium auf einen Wert von 0,45 eingestellt, was einer Bakterienkonzentration von 10⁹ cfu / ml entspricht. Die Bakterienkultur wurde mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15 % (v/v) versetzt, in Portionen von 0,5 ml in Cryogefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, und bei -80°C gelagert.

B.2.4 *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer in embryogenen Pollenkulturen von Gerste nach Kumlehn *et al.* (2006)

Vorkultur der Bakterien

Zur Anzucht der *A. tumefaciens*-Kulturen für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in embryogene Pollenkulturen wurden 10 ml CPY-Medium mit Spectinomycin (50 µg/ml) und Tetracyclin (5 µg/ml) mit 0,5 ml Standardinokulum (vgl. B.2.3) angeimpft und bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Nach ca. 24 h (und 1 bis 5 Stunden vor der Co-Kultur mit embryogenem Pollen) wurde die Flüssigkultur auf zwei sterile Zentrifugenröhrchen (Cellstar® Polystyrol; 12 ml von Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) verteilt und bei 4.000 rpm und 20°C für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R). Nach Aufnahme des Sediments in jeweils 2,5 ml CK-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Teilvolumina der Bakteriensuspension in einem 50 ml Erlenmeyerkolben vereinigt und bis zur Transformation bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Die OD₅₅₀ wurde im Photometer der Firma Pharmacia bestimmt und das Teilvolumen der Suspension, das erforderlich war um eine finale Bakterienkonzentration von 2,5 x 10⁷ cfu / ml Co-Kulturmedium zu erhalten, wurde errechnet.

Gentransfer in embryogenen Pollenkulturen

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wurden sieben bis acht Tage alte embryogene Pollenkulturen verwendet.

Das KBP-Medium der Pollenkultur wurde mittels Finnpipette (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) abgezogen und durch 1 ml CK-Medium (Tab. B-3) ersetzt. Dann wurde das berechnete Volumen der Bakteriensuspension zugegeben, um eine *Agrobacterium*-Endkonzentration von 2,5 x 10⁷ cfu / ml im Co-Kulturansatz zu erreichen.

Die Petrischalen (Ø 3,5 cm) mit vereinigter Pollenkultur und Bakteriensuspension wurden unversiegelt für 48 h im Dunkeln bei 21°C und 65 rpm inkubiert.

Parallel wurden „Feeder“-Kulturen vorbereitet. Untransformierte embryogene Pollenkulturen wurden mit 0,5 ml KBP-Medium versetzt und ebenfalls für 48 h bei 26°C im Dunkelschrank inkubiert.

Nach 48 h wurde das CK-Medium aus der Co-Kultur mit einer Finnpipette abgezogen und die Pollen wurden mit 0,4 ml Ast-Medium (vgl. Tab. B-3) mit Timentin (200 mg/l) und Hygromycin (25 µM) gewaschen. Das Waschmedium wurde abgezogen und durch 1,0 ml Ast-Medium (vgl. Tab. B-2) mit Timentin (200 mg/l) und Hygromycin (25 µM) sowie 0,1 ml einer gut suspendierten „Feeder“-Pollenkultur versetzt. Die Petrischalen (Ø 3,5 cm) wurden mit Nescofilm verschlossen und für sieben Tage bei 26°C und 75 rpm inkubiert. Danach wurde das Ast-Medium abgezogen, 1 ml S₃Gn-Medium mit 200 mg/l Timentin und 100 µM Hygromycin (vgl. Tab. B-3) wurden zugegeben und die Petrischalen versiegelt. Nach erneuter Inkubation für sieben Tagen bei 26°C und 65 rpm wurde das Medium durch frisches S₃Gn-Medium mit 200 mg/l Timentin und 100 µM Hygromycin ersetzt. Eventuell entstandene, potentiell transgene Kallusstrukturen wurden auf autoklavierte Filterscheiben (Ø 45 mm, Rundfilter MN 640d; Macherey-Nagel, Düren) auf KBPDT-Platten (Ø 10 cm, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) mit 100 µM Hygromycin (vgl. Tab. B-3) übertragen und für 2 Wochen im Dunkelschrank bei 26°C inkubiert. Anschließend wurden die transgenen Kallusstrukturen auf K4NBT-Platten (Ø 10 cm) mit 50 µM Hygromycin (vgl. Tab. B-3) ohne Filter umgesetzt und eine Woche im Dunkelschrank bei 26°C sowie anschließend zwei Wochen im Licht bei 17°C inkubiert. Der Transfer der Kallusstücke auf K4NBT-Platten (Ø 10 cm) mit 50 µM Hygromycin (vgl. Tab. B-3) wurde insgesamt zweimal wiederholt, die Inkubation erfolgte nun permanent im Licht bei 17°C. Sich entwickelnde Gerstenpflanzen wurden in Boxen mit K4NBT-Medium mit 50 µM Hygromycin (vgl. Tab. B-3) überführt und für bis zu vier Wochen weiter im Licht bei 17°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Übertragung der regenerierten Gerstenpflanzen in Erde (vgl. B.2.3) und die Überprüfung auf integrative Transformation und Transgen-Kopienzahl mittels PCR und nachfolgender Southern Analyse (vgl. B.2.7 und B.2.8.1).

Identifikation doppelhaploider transgener Pflanzen

Die Genomverdopplung der regenerierten haploiden Pflanzen zum diploiden Chromosomensatz ereignet sich spontan (Li und Devaux 2003) oder kann alternativ durch Behandlung mit 0,1 % (w/v) Colchizin stimuliert werden (Kumlehn *et al.* 2006). Die Unterscheidung zwischen haploiden und doppelhaploiden Pflanzen (Pflanzen mit verdoppeltem Chromosomensatz, DH) erfolgte durch Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellkerne mithilfe eines Durchflusscytometers (PA Ploidy Analyser) unter Verwendung der CyStain UV Ploidy Staining Solution (beides Partec GmbH, Münster) nach Angaben des Herstellers. Als Kontrollmaterial diente diploide Gerste des Kultivars Igri.

Für die Colchicinbehandlung wurden als haploid identifizierte Pflanzen über Nacht bei 10°C inkubiert, anschließend aus der Erde genommen und gründlich gereinigt. Die Wurzeln wurden auf ca. 1–2 cm gekürzt sowie sämtliche Blätter auf eine Länge von ca. 5 cm gestutzt. So vorbereitet wurden die Pflanzen in 50-ml Röhren eingebracht und bis oberhalb des Vegetationskegels in 0,1 % (w/v) Colchicin [0,8 % (v/v) DMSO; 0,05 % (v/v) Tween20] bedeckt. Die Röhren mit PE-Haushaltsfolie abgedeckt und für 6 h bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen intensiv mit bidest. H₂O gewaschen und wieder in Pflanztöpfe mit Erde überführt.

Nomenklatur transgener Linien von *H. vulgare*

Transgene Gerstenlinien, die durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in embryogene Pollenkulturen unter Verwendung des Binärvektors pSB262 hergestellt wurden und in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie zu Beginn der Arbeiten bereits vorlagen, wurden mit der Abkürzung PS und mit Zahlen von 300 aufwärts bezeichnet. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Gerstenlinien wurden hingegen mit der Abkürzung BA und Zahlen von eins aufwärts bezeichnet.

B.2.5 Kreuzung von Gerste und Erzeugung doppelhaploider F₁ Linien

Kreuzung homozygoter transgener Gerstenlinien

Die gezielte Kreuzung ausgewählter Mutter- (♀) und Vaterpflanzen (♂) erforderte im Fall der zwittrigen Blüte der selbstbefruchtenden Gerste manuelle Eingriffe. Hierfür erfolgte die Emaskulation der als Pollenakzeptor dienenden transgenen Gerstenlinie. Die im dafür geeigneten Stadium befindliche Ähren sind noch vollständig von der Blattscheide umhüllt, die Grannen ragen ca. 3 bis 6 cm aus der Blattscheide heraus und die Stamina sind hellgrün und noch nicht geöffnet. Die Ähren wurden vorsichtig zu 1/3 aus der vorher mit einer Pinzette aufgeschlitzten Blattscheide herausgezogen, sodass die Grannen sich noch in der Blattscheide befanden. Die sterilen Seitenblütchen der zweizeiligen Gerste wurden mit einer Pinzette entfernt. Von jeder der ca. 20-22 Blüten der Ähre wurden mit einer Pinzette die drei unreifen Staubblätter entfernt. Die emaskulierte Ähre wurde daraufhin eingetütet und nach 2-3 Tage bestäubt. Dazu wurden die Blüten des Pollendonors mit einer Pinzette „aufgeschlitzt“ und visuell begutachtet. Wenn die Antheren gelb waren und stäubten, wurden ein bis zwei Staubblätter entnommen und in ein emaskuliertes Blütchen übertragen. Die bestäubte Ähre wurde wieder eingetütet, bis ca. 12 bis 15 Tagen nach der Bestäubung der Einsatz des *Embryo-rescue* Verfahrens zur Regeneration der F₁-Pflanzen erfolgte.

Embryo-rescue Verfahren zur Erzeugung von F₁-Hybriden aus transgenen Linien

Ca. 12 bis 15 Tage nach der Bestäubung wurden aus den manuell bestäubten Ähren die unreifen Gerstenkaryopsen präpariert und von den Spelzen befreit. Zur Oberflächensterilisation wurden die Gerstenkaryopsen für 3 min in 70 % (v/v) Ethanol inkubiert und danach mit sterilem bidest. H₂O gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation für 15 min in 20 % (v/v) Natriumhypochlorid (mit 3 bis 5 Tropfen Tween[®]20 pro 400 ml) gefolgt von 4 bis 5 Waschschritten mit sterilem bidest. H₂O. Aus den oberflächensterilisierten Gerstenkaryopsen wurden unter dem Stereomikroskop (Stemi 1000, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) die Embryonen isoliert. Dazu wurden die unreifen Körner längs halbiert und die Embryonen aus dem sie umgebenden Endosperm entnommen. Zur Weiterkultur wurden Embryonen verwendet, die eine Größe von ca. 1 bis 1,5 mm hatten.

Die präparierten Gerstenembryonen wurden für 3 bis 5 Tage auf B5-Platten (Ø 10 cm, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Tab. B-4) mit 100 mg/ml Timentin im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Danach wurden die sich entwickelten Keimpflanzen in Boxen mit B5-Medium (Anhang G, Tab. G-1) mit 100 mg/ml Timentin und 50 µM Hygromycin (für transgene Pflanzen mit Hygromycin-Resistenz) im Licht bei 20°C weiter kultiviert. Anschließend erfolgten die Übertragung der transgenen Gerstenpflanzen in Erde (vgl. B.2.3) und die Weiterkultur im Gewächshaus bis zum Einsetzen der Blüte. Der *Embryo-rescue* Ansatz erlaubte im Vergleich zum natürlichen Abreifen und Keimen der F₁-Körner eine Zeitersparnis von ca. sechs bis acht Wochen.

Herstellung doppelhaploider transgener Linien mittels embryogener Pollenkultur

Die Erzeugung doppelhaploider Gerstenlinien aus der heterozygoten transgenen TDH1/2Ls-F₁-Generation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kumlehn *et al.* (2006) (vgl. B.2.4). Von den F₁-Pflanzen wurden dazu wie oben beschrieben embryogene Pollenkulturen mit einer Populationsdichte von 100.000 Pollen pro ml KBP-Medium mit 150 mg/ml Timentin hergestellt und in mit Parafilm verschlossen Petrischalen (Ø 3,5 cm) für zunächst 48 h im Dunkeln bei 20°C inkubiert. Am selben Tag wurden aus dem Weizenkultivar *Bobwhite* (*Triticum aestivum* L.) unreife Fruchtknoten (in etwa zum Zeitpunkt der ersten Pollenmitose) aus dem mittleren Drittel der Ähre unter sterilen Bedingungen präpariert (Coronado *et al.*, 2005). Je 25 Fruchtknoten wurden in 2 ml KBP-Medium mit 150 mg/ml Timentin in Petrischalen (Ø 3,5 cm) für 48 h bei 12°C inkubiert.

Nach 48 h erfolgte bei den embryogenen Pollenkulturen die Zugabe von 1 ml KBP-Medium und 150 mg/ml Timentin und der Transfer von fünf Fruchtknoten pro Petrischale. Die Inkubation wurde danach für sieben Tage bei 20°C im Dunkeln fortgesetzt. Anschließend wurde den Petrischalen erneut 1 ml KBP-Medium mit 150 mg/ml Timentin zugegeben und

die Kulturen wurden für weitere zwei bis drei Wochen im Dunkeln bei 20°C und sanftem Schütteln (50 rpm) weiter kultiviert. Sich während dieser Zeitspanne entwickelnde Kalli und embryoartige Strukturen wurden auf KBPD-Platten mit 150 mg/ml Timentin und 100 µM Hygromycin (für transgene Pflanzen mit Hygromycin-Resistenz) mit aufgelegten autoklavierten Filterscheiben (Ø 45 mm, Rundfilter MN 640d; Macherey-Nagel, Düren) überführt und für 2 Wochen im Dunkelschrank bei 26°C inkubiert. Die sich zunehmend differenzierenden Kalli und embryoartigen Strukturen wurden danach auf K4NB-Platten mit 150 mg/ml Timentin und 50 µM Hygromycin (ohne Filterscheibe) umgesetzt und nach 1 Woche im Dunkelschrank bei 26°C für 2 Wochen im Lichtraum bei 17°C weiter kultiviert. Der Medienwechsel auf K4NB-Platten mit 150 mg/ml Timentin und 50 µM Hygromycin wurde insgesamt zweimal wiederholt. Die regenerierten transgenen Gerstenpflanzen der TDH1/2Ls der F₁ Generation wurden schließlich in Boxen mit K4NB-Medium mit 150 mg/ml Timentin und 25 µM Hygromycin weiter kultiviert.

Anschließend erfolgte die Übertragung der transgenen Gerstenpflanzen der TDH1/2Ls der F₁ Generation in Erde (vgl. B.2.3). Doppelhaploide Pflanzen wurden wie oben beschrieben durch Durchflusszytometrie identifiziert (vgl. B.2.4). Danach erfolgten die Überprüfung des transgenen Status und die Bestimmung der T-DNA-Kopienzahl mittels PCR und nachfolgender Southern Analyse (vgl. B.2.8.1).

B.2.6 Isolierung genomischer DNA

A. thaliana

Die Präparation von genomischer DNA aus Rosettenblättern wurde mittels des *DNeasy Plant Mini* Kit und des *DNeasy Plant Maxi* Kit der Firma Qiagen entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

***H. vulgare* (nach Palotta et al. 2000)**

In einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit zwei Stahlkugeln wurden 200-400 mg an jungem Blattmaterial in flüssigen Stickstoff eingefroren. Durch Schütteln in einer Schwingmühle (Retsch MM 400, Haan) für 2 Minuten und 27 Hz wurde das Blattmaterial aufgeschlossen, anschließend in 800 µl 100 mM Tris (pH 8,0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8,0) und 0,5 % (w/v) N-Laurylsarkosin aufgenommen und durch Vortexen für etwa eine Minute suspendiert. Zur Entfernung von Proteinen wurden 800 µl Phenol/Chloroform/IAA zugegeben und durch zwei Minuten vorsichtiges Schwenken mit dem Gewebehomogenisat gemischt. Nach Zentrifugation bei 5.000 rpm für drei Minuten bei 20°C (Eppendorf Centrifuge 5415/5451R) zur Trennung in organische und wässrige Phase wurde der klare wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde durch

Zugabe von 80 µl 3M NaAcetat (pH 5,2) und 800 µl Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde mit 800 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für ca. 30 Minuten luftgetrocknet. Die trockene DNA-Präparation wurde in 100 µl 1 M TE-Puffer (pH 8,0) und 0,4 µg/ml RNase A resuspendiert und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der DNA Qualität im Agarosegel wurde die genomische DNA für PCR und Southern-Analyse (B.2.7 und B.2.8.1) eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

B.2.7 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde für die gezielte Amplifikation von DNA-Bereichen mit zwei spezifischen Oligonucleotiden (Primer) und einer hitzebeständigen DNA Polymerase eingesetzt. Sie erfolgte in einem *Thermocycler* (Eppendorf Master Cycler gradient) der Firma Eppendorf (Wesseling-Berzling) mit Puffer und Go-Taq-Polymerase der Firma Promega (Mannheim) sowie dNTPs der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe). Die Charakterisierung von T-DNA Insertions- und Punktmutationslinien in *A. thaliana* sowie die Überprüfung auf T-DNA Integration in transformierten Gerstenlinien wurde anhand der in Tab. B-6 dargestellten Primerpaare und nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tab. B-5).

Tabelle B-5: PCR Ansatz zur Charakterisierung von T-DNA Insertions- und Punktmutationslinien in *A. thaliana* sowie die Überprüfung auf integrierte T-DNA in transformierter Gerste.

Komponenten	Stammlösung	1 x (µl)
Puffer	5 x	5,0
MgCl ₂	25 mM	3,0
dNTPs	10 mM	0,5
Primer f	10 pmol/µl	0,25
Primer r	10 pmol/µl	0,25
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,15
bidest. H ₂ O	-	ad 25 µl
DNA	ca. 1 µg	1,0

Tabelle B-6: Oligonukleotide für die Charakterisierung von T-DNA Insertions- und Punktmutationslinien in *A. thaliana* sowie den Nachweis integrierter T-DNA in transformierter Gerste.

Oligonukleotid	Sequenz (5 '-3')	Produktlänge
GABI-Kat-Linien (<i>A. thaliana</i>)		
LB f (08418)	GCAATGAGTATGATGGTCAATATG	
LB r (08760)	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC	366 bp
RB f (02588)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG	
RB r (03269)	GAAGGCGGGAAACGACAATCTG	680 bp
<i>rdr2-gk f</i>	AAGGGCGTCTCCGTAAGTA	
<i>rdr2-gk r</i>	CATGATTAACCCAAGAGAAAAGAG	945 bp
<i>rdr5-gk f</i>	CGTATGCATTTTTATGCACGTG	
<i>rdr5-gk r</i>	ACTTCCAAGGCGTTAAAGGTG	935 bp
SAIL-Linien (<i>A. thaliana</i>)		
LB f	ATCAACATGCTACCCTCCGCGAGA	
LB r	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	383 bp
RB f	CTTGGAGCGAACGACCTACAC	
RB r	TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT	529 bp
<i>rdr2-1 f</i>	ACACATTAGGACTAACAAATTTACC	
<i>rdr2-1 r</i>	ATGGTGGTGTGACAGACGACGACGAACCGATCA	579 bp
<i>rdr5-sl f</i>	TGCATATGAAACTCGGAGACC	
<i>rdr5-sl r</i>	ATTCGCCACTGCTTCTTTTC	1050 bp
Linien nach Peragine et al., (2004) (<i>A.thaliana</i>) mit CAPS Primer, größtes Fragment nach Spaltung mit <i>TaqI</i>		
<i>rdr6-11 f</i>	TACTGTCCCTGGCGATCTCT	
<i>rdr6-11 r</i>	CCACCTCACACGTTCTCTT	187 bp
nach <i>TaqI</i> Spaltung: 15, 80 und 92 bp für <i>RDR6/rdr6-11</i> ; 80 und 107 bp für <i>rdr6-11</i>		
<i>rdr6-13 f</i>	TCGAGGACCTGTACTTTGTGGCT	
<i>rdr6-13 r</i>	TTCTATCAGCATGAACGACGTGTGCAT	207 bp
nach <i>TaqI</i> Spaltung: 11, 62 und 134 bp für <i>RDR6/rdr6-13</i> ; 11 und 196 bp für <i>rdr6-13</i>		
<i>rdr6-14 f</i>	ACAATCGATGACCATGAAAATCTCAG	
<i>rdr6-14 r</i>	AGAGACGCTGAGCAAGAACTTAG	277 bp
nach <i>TaqI</i> Spaltung: 13, 52, 212 bp für <i>RDR6/rdr6-14</i> ; 13 und 264 bp für <i>rdr6-14</i>		
GUS 2xr 126-Linie (<i>A. thaliana</i>)		
<i>chr1-3 f</i>	CGACAGTTTCACTTGTTTCAGATGC	
<i>chr1-3 r</i>	GCTAGGATAACCACTCTACTGC	800 bp
GUS f	GCCGGGCAATTGCTGTGCCAGG	
GUS r	CGCCTGTAAGTGCCTTGCTGAG	1050 bp
T-DNA Linien (pSB262) (Gerste)		
GFP f	GGTCACGAACTCCAGCAGGA	
GFP r	GACCACATGAAGCAGCACGA	450 bp
Hyg f	CCATGGATGCGATCGCTGCGG	
Hyg r	GATCGGACGATTGCGTCGCA	544 bp

Die PCR wurde mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min begonnen, darauf folgte die Amplifikation bei 95°C für 30 sec / Ta für 45 sec / 72°C für (mindestens) 1 min über 30 Zyklen und ein Abschlussschritt bei 72°C für 10 min.

Die *Annealing*-Temperatur (T_a) wurde so gewählt, dass sie 5°C unter der niedrigeren der Schmelztemperaturen der verwendeten Primer lag. Für die Dauer der Elongationsphase war die Länge des zu amplifizierenden Fragments ausschlaggebend. Pro 1 kb Produktlänge wurde 1 min berechnet. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels 1,5 % (w/v) Agarose-Gelelektrophorese (Agarose, SeaKem, Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf) in 1xTBE (pH 8.0) mit 1,0 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Gleichspannung von 5,5 V pro cm Gellänge. Vom 25 µl PCR-Ansatz wurden 10 µl des Ansatzes und 2 µl mit Ladepuffer [0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylene cyanol; 30 % (v/v) Glycerin] aufgetragen. Definierte Mengen an DNA Marker [SmartLadder™ (200-10.000 bp), Eurogentec Deutschland GmbH, Köln] wurden zur Abschätzung der Größe sowie der DNA-Menge aufgetragen. Die Verteilung der DNA-Fragmente in den Agarosegelen wurde mit einem UV-Transilluminator (Herolab E.A.S.Y. 440K, Wiesloch) visualisiert und per CCD-Kamera dokumentiert.

Der Nachweis von Mutationen der Punktmutationslinien *rdr6-11*, *rdr6-13* und *rdr6-14* erfolgte mit CAPS-Markern (Tab. B-6). Die PCR-Produkte wurden mit der Restriktionsnuklease *TaqI* (Fermentas, 10 U) zerlegt und die charakteristischen Produkte wurden gelelektrophoretisch auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel (5,5 %) mit dem 4300 DNA-Analyser (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg) analysiert.

B.2.8 Southern und Northern Analysen

Für die Bestimmung der Zahl der T-DNA Insertionen der GABI-Kat und SAIL Linien von *A. thaliana* sowie der Transgen-Kopienzahl in transgenen Gerstenlinien erfolgte die Southern-Analyse nach Southern (1975) in der Adaption für den Roche Digoxigenin-Kit (DIG Application Manual for Filter Hybridisation 2003). Der Nachweis von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA von *A. thaliana* erfolgte durch Southern-Hybridisierungen unter Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen in der Variation nach Mette *et al.* (1999). Den Nachweis von siRNAs in *A. thaliana* und *H. vulgare* mittels Northern-Blot Analyse erfolgte in Anlehnung an Mette *et al.* (2005).

2.8.1 Southern-Analyse

Bestimmung der T-DNA Kopienzahl

Ca. 1 µg genomische DNA aus *A. thaliana* wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BstEII* (Fermentas; 10 U) in einem 300 µl Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA im

Restriktionsansatz wurde mit 875 µl 100 % (v/v) Ethanol, 35 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 6,5 µl 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0) über Nacht bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min in einer Eppendorf-Zentrifuge (5415R) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Sediment wurde im offenen Reaktionsgefäß im Exsikkator unter Vakuum 30 min getrocknet. Die DNA im Restriktionsansatz wurde in 30 µl sterilisiertem bidest. H₂O aufgenommen.

Als negative Kontrollen dienten ungespaltene und gespaltene DNA-Präparationen aus nichttransformierten *A. thaliana* Pflanzen der Akzession Col-0.

Ca. 30 µg genomische DNA von *H. vulgare* wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Clal* (Fermentas, 10 U) in einem 50 µl Ansatz über Nacht gespalten. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 65°C für 20 min. Als Negativkontrolle dienten nicht-transformierte Pflanzen des Kultivars Igri. Als Positivkontrolle wurde pro Gelspur 80 pg des Plasmids pSB262 (vgl. B.1.5) verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze erfolgte über Nacht in 0,8 % (w/v) Agarosegelen (Agarose Type V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 1xTBE bei einer Gleichspannung von 1,5 V pro cm Gel.

Zur Denaturierung der dsDNA wurde das Agarosegel für zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und anschließend zweimal 15 min in Neutralisierungspuffer (1,0 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) erfolgte über Nacht mit 20xSSC (3,0 M NaCl 0,3 M Na-citrat; pH 7,0) mit Hilfe der Blotting Apparatur „TurboBlotter“ und Blottingpapier (Whatman 3MM und GB004) nach den Angaben der Firma Whatman® Schleicher & Schuell (Dassel). Die Membran wurde nach dem Transfer 5 min in 2xSSC gespült und zur Fixierung der DNAs beidseitig mit 1,2 mJ/cm² UV Licht bestrahlt (UV Crosslinker, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA).

Die Digoxigenin-markierten DNA Sonden wurden mit dem *PCR DIG Probe Synthesis Kit* laut Angaben der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) hergestellt.

Für die unterschiedlichen Digoxigenin-markierten DNA-Sonden wurden die in Tab. B-7 angegebenen Primer nach dem folgenden Protokoll verwendet (Tab. B-8).

Tabelle B-7: Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von Hybridisierungssonden.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Produktlänge
GABI-Kat-Linien (<i>A. thaliana</i>)		
LB f (08418)	GCAATGAGTATGATGGTCAATATG	
LB r (08760)	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC	366 bp
RB f (02588)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG	
RB r (03269)	GAAGGCGGGAAACGACAATCTG	680 bp
SAIL-Linien (<i>A. thaliana</i>)		
LB f	ATCAACATGCTACCCTCCGCGAGA	
LB r	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	383 bp
RB f	CTTGGAGCGAACGACCTACAC	
RB r	TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT	529 bp
T-DNA Linien (pSB262; Gerste)		
GFP f	GGTCACGAACTCCAGCAGGA	
GFP r	GACCACATGAAGCAGCACGA	450 bp
Hyg f	CCATGGATGCGATCGCTGCGG	
Hyg r	GATCGGACGATTGCGTCGCA	544 bp

Tabelle B-8: PCR Ansatz für digoxigenierte Sondenfragmente.

Komponenten	Stammlösung	1 x (µl)
Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	10 x	5,0
DIG label	200 µM dATP, dCTP, dGTP 130 µM dTTP 70 µM DIG-dUTP	} 5,0
Primer f	10 pmol/µl	5,0
Primer r	10 pmol/µl	5,0
Enzyme Mix	3,5 U/µl	0,75
DNA		
genomische DNA	20 ng	1,0
Plasmid-DNA	20 pg	1,0
bidest. H ₂ O	-	ad 50 µl

Die PCR erfolgte mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min, Amplifikation bei 95°C für 30 sec / Ta für 45 sec / 72°C für 1 min über 30 Zyklen und einem Abschluss-Schritt bei 72°C für 7 min. Die *Annealing*-Temperatur (T_a) wurde so gewählt, dass sie 5°C unter der niedrigeren der Schmelztemperaturen der verwendeten Primer lag.

Die Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde erfolgte nach dem Handbuch "*DIG Application Manual for Filter Hybridisation*" (Roche Diagnostics, 2003) unter Verwendung der *DIG Easy Hyb Granules* der Firma Roche Diagnostics. *DIG Easy Hyb Granules* wurden mit bidest. H₂O nach den Angaben des Herstellers versetzt. Die Lagerung der Hybridisierungslösung für spätere Anwendungen erfolgte bei -20°C.

Für die Hybridisierung wurden Hybridisierungsflaschen und -ofen der Firma Biometra Biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen) genutzt. Die Membran wurde 2 bis 5 h bei 50°C in Hybridisierungslösung ohne DIG-markierte Sonde inkubiert. Anschließend wurde die Vor-Hybridisierungslösung entfernt und neue Hybridisierungslösung mit frisch denaturierter, DIG-markierter Sonde und einer Konzentration von 20-25 ng / ml zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran unter Schwenken zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 2xSSC; 0,1 % (w/v) SDS und anschließend zweimal 15 min bei 68°C mit 0,1xSSC; 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

Für eine spätere Wiederverwendung wurde die Hybridisierungslösung mit DIG-markierter Sonde bei -20°C gelagert. Für den erneuten Gebrauch wurden sowohl die Hybridisierungslösung mit oder ohne DIG-markierter Sonde 10 min im Wasserbad bei 68°C inkubiert. Eine ein- bis zweimalige Wiederverwendung der Hybridisierungslösung mit DIG-markierter Sonde war möglich.

Die Detektion der DIG-markierten Sonde auf der Membran erfolgte mit „*Anti-Digoxigenin Fab Fragment*“ Antikörpern und *CSPD ready to use* (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben im Handbuch für das DIG-System (Roche Diagnostics, Mannheim, 2003).

Zur Detektion von spezifisch gebundenen digoxigenierten Sonden wurde die Membran unter leichtem Schütteln bei RT für 5 min in *DIG1* (150 mM NaCl; 100 mM Maleinsäure; pH 7,5) mit 0,3 % (v/v) Tween® 20, 1h in *DIG2* (150 mM NaCl; 100mM Maleinsäure; pH 7,5; 1 % (w/v) Roche Blocking Reagent) und 30 min in *DIG2* mit zugesetztem *Anti-Digoxigenin Fab Fragment* (Verdünnung 1:10.000) inkubiert.

Zum Entfernen unspezifisch anhaftender *Anti-Digoxigenin Fab Fragmente* wurde zweimal 15 min in *DIG1* (150 mM NaCl; 100 mM Maleinsäure; pH 7,5) mit 0,3 % (v/v) Tween® 20 bei RT gewaschen.

Die Detektion der spezifisch gebundenen Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente erfolgte mittels Chemilumineszenz. Nach Äquilibrierung der Membran für 5 min in *DIG3* (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; pH 9,5) wurden auf einer Klarsichtfolie 1,0 bis 2,0 ml *CSPD ready to*

use auf die Membran aufgebracht und für 5 min offen inkubiert. Die Membran wurde in einen Probenbeutel (18 x 20 cm; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Nach dem Aufbringen der *CSPD ready to use* Lösung und Vorinkubation wurde Chemolumineszenz-Film (Hyperfilm™ ECL, enhanced chemiluminescence, GE Healthcare, München) bei Raumtemperatur exponiert und anschließend entwickelt. Je nach Signal- und Hintergrundintensität lagen die optimalen Expositionszeiten zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden.

Für eine erneute Hybridisierung einer Membran mit einer zweiten oder dritten Sonde wurde die vorhandene Sonde abgewaschen. Die Membran wurde 5 min bei Raumtemperatur in bidest. H₂O leicht geschüttelt und anschließend im Hybridisierungssofen für zweimal 15 min bei 37° in alkalischer Waschlösung (0,2 N NaOH; 0,1 % (w/v) SDS) inkubiert. Danach erfolgte die erneute Hybridisierung wie bei einer noch nicht hybridisierten Membran.

DNA Methylierungsanalyse

Ca. 1 µg genomische DNA von *A. thaliana* wurde mit je 10 U der Restriktionsenzyme *Eco32I* und *DraI* (Fermentas) sowie zeitgleich mit 10 U von einem der für Cytosin-Methylierung sensitiven Restriktionsenzyme *Bsp68I*, *XbaI* oder *Alw26I* (Fermentas) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Fällung und Aufnahme der gespaltenen DNA erfolgte wie oben beschrieben.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 2 h in 1.0 % (w/v) Agarosegelen (Agarose Type V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 1xTBE bei einer Gleichspannung von 8 V pro cm Gel. Zur Denaturierung der dsDNA wurde das Agarosegel für 45 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und anschließend zweimal 45 min in Neutralisierungspuffer (1,0 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer der DNA auf eine Nitrocellulose-Membran Protran BA 85 (Whatman GmbH, Dassel) erfolgte über Nacht mit 10xSSC (1,5 M NaCl 0,15 M Na-citrat; pH 7,0) mit Hilfe der Blotting Apparatur „TurboBlotter“ und Blottingpapier (Whatman 3MM und GB004) nach den Angaben der Firma Whatman® Schleicher & Schuell (Dassel). Die Membran wurde nach dem Transfer 5 min in 6xSSC gespült und zur Fixierung der DNA unter Vakuum zwei Stunden bei 80°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Membranen entweder direkt hybridisiert oder zwischen zwei Lagen Filterpapier (Whatman 3MM, Whatman GmbH, Dassel) bei Raumtemperatur gelagert.

Die Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden erfolgte durch *in vitro* Transkription nach Mette *et al.* (2005). Es wurden 2,5 µl geschnittene Plasmid-DNA (1 µg/µl), 10,0 µl *in vitro* Transkription Puffer (5x, Fermentas, St. Leon Rot), 3,75 µl ATP; CTP; GTP (6,6 mM); 2,5 µl DTT (0,2 M), 25,0 µl [α -³²P]-UTP (250 µCi, Kat.-Nr. SRP210, Hartmann Analytic, Braunschweig), 3,75 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) und 2,5 µl T7 RNA Polymerase (20 U/µl,

Fermentas, St. Leon Rot) gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht inkorporiertes ³²P wurde durch Zentrifugation durch eine Säule mit 0,5 ml Sephadex G50 in 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 % (w/v) SDS aus dem Ansatz entfernt.

Die Hybridisierung erfolgte in Kunststoffbeuteln in Church-Gilbert Hybridisierungspuffer [250 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7,2; 7 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 10 mg / ml BSA] bei 64°C. Die Membran wurde ca. 6 bis 8 h in Hybridisierungslösung ohne Sonde im offenen Beutel vorinkubiert. Dann wurde die Sonde zugegeben, der Beutel verschlossen und die Hybridisierung über Nacht bei 64°C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran aus dem Beutel entnommen und 2 mal 30 min bei 64°C in 20 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7,2; 0,8 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA gewaschen.

Die Exposition von Röntgenfilmen Bio Max (Kodak Industrie, Cedex, Frankreich) erfolgte in einer Verstärkerkassette bei -80°C für 2 bis 3 Tage.

Bei starkem Hintergrundsignal wurden die Membranen mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 60 mM NaCl und 10 µg / ml RNaseA für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Membranen bei Raumtemperatur in 50 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7,2 gewaschen und die Exposition von Röntgenfilm Bio Max (Kodak Industrie, Cedex, Frankreich) erfolgte erneut bei -80°C für ca. 14 Tage.

2.8.2 Northern-Analyse

Die Präparation von RNA und siRNAs erfolgte aus Rosettenblättern von unter Kurztagbedingen angezogenen, 9 Wochen alten, *A. thaliana* Pflanzen sowie aus reifen Gerstenkaryopsen mithilfe der Qiagen RNeasy[®] Midi/Maxi Kits nach einem Protokoll des Herstellers (www.qiagen.com/literature/).

Zur Präparation wurden ca. 500-800 mg *A. thaliana* Blattmaterial oder ca. 500-600 mg gemahlene Gerstenkörner eingesetzt. Die Rosettenblätter von *A. thaliana* wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und durch Vortexen mit 5 „grinding spheres“ (Roche Diagnostics) für 1 min zu feinem Pulver zermahlen. Die Gerstenkörner wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und mit Hilfe von Stahlkugeln in einer Schwingmühle (Retsch MM 200, Haan, für 2 Minuten bei 27 Hz) vermahlen.

Das pulverisierte Blatt- bzw. Kornmaterial wurde in 15 ml TRIzol[®] Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgenommen und bei RT durch Vortexen suspendiert. Die Suspension wurde in ein 30 ml Corex-Röhrchen (Kimble Corex-Röhrchen, 30 ml, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) überführt und mit 3 ml Chloroform versetzt. Anschließend wurde die Suspension durch leichtes Vortexen vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation bei 6.500 rpm für 30 Minuten bei 4°C (Sorvall-Zentrifuge, HS6 Rotor; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) zur Trennung der organischen und wässrigen Phase, wurde der klare

wässrige Überstand (5 bis 8 ml) in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt und auf Eis gelagert. Danach wurde 1 Volumen 80 % (v/v) Ethanol zum klaren Überstand im 50 ml Zentrifugenröhrchen hinzugegeben. Die Mischung wurde auf eine RNeasy[®] Maxi Säule (Qiagen RNeasy[®] Maxi Kit) gegeben und durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und 20°C durch die Säule gefiltert (Heraeus Megafuge 1.0R; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Der Durchfluss wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und zur späteren Isolierung der siRNA auf Eis gelagert.

Zur Isolierung der „langen“ RNA wurde die RNeasy[®] Maxi Säule (Qiagen RNeasy[®] Maxi Kit) mit 15 ml *RW1*-Puffer beladen und anschließend für 5 Minuten bei 4.000 rpm und 20°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses erfolgte ein erneuter Waschschritt der RNeasy[®] Maxi Säule mit 15 ml *RPE*-Puffer sowie Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm und 20°C. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt und anschließend wurde erneut zentrifugiert. Die RNeasy[®] Maxi Säule wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 1,2 ml RNase-freies bidest. H₂O wurden auf die Membran der RNeasy[®] Maxi Säule aufgebracht. Nach Inkubation für eine Minute bei RT erfolgte Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm und 20°C. Das Eluat mit der „langen RNA“ wurde bei -20°C gelagert.

Der oben genannte Durchfluss nach der Bindung der „langen“ RNA an die RNeasy[®] Maxi Säule diente zur Isolierung der siRNA. Hierzu wurde ein 1,4-faches Volumen 100 % (v/v) Ethanol zugegeben und die gesamte Lösung (10 bis 25 ml) wurde in mehreren Zentrifugationsschritten (jeweils für 5 min bei 4.000 rpm und 20°C) durch eine RNeasy[®] Midi Säule (Qiagen RNeasy[®] Midi Kit) zentrifugiert. Dabei wurden nun die siRNA an die Säulenmatrix gebunden. Die RNeasy[®] Midi Säule wurde zweimal mit 5 ml *RPE*-Puffer gewaschen, nach jedem Schritt erfolgte Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm und 20°C. Die RNeasy[®] Midi Säule wurde in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 250 µl RNase-freies bidest. H₂O wurde auf die Membran der RNeasy[®] Midi Säule aufgebracht. Nach Inkubation für eine Minute bei RT erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm und 20°C. Das Eluat mit der siRNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der isolierten „langen“ RNA sowie der angereicherten siRNA wurde UV-photometrisch bestimmt. Typische Ausbeuten für siRNA lagen bei 10 µg pro Ansatz. Die in einem Volumen von 250 µl erhaltene siRNA wurde nach Zugabe von 28 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 700 µl 100 % (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge (5415R). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet Sediment im offenen Reaktionsgefäß im Exsikkator unter Vakuum 30 min getrocknet. Die siRNA wurde in 10 µl RNase-freiem bidest. H₂O aufgenommen.

Die siRNAs wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in einem 15 % Polyacrylamid-Gel mit der in Tab. B-9 angegebene Zusammensetzung aufgetrennt.

Tabelle B-9: Zusammensetzung des Polyacrylamid Gels zur Auftrennung von siRNAs.

Komponente	Stammlösung	Endvolumen (1x, Endkonzentrationen)
Harnstoff	1 M	28,8 g (7 M)
Acrylamide	30 % (v/v)	30,0 ml (15 % (v/v))
TBE	10x	1,35 ml (0,225 x)
APS	40 % (w/v)	62,5 µl
TEMED	100 % (v/v)	40,0 µl
bidest.H ₂ O		6,0 ml

Die in 10 µl aufgenommenen siRNA Proben (10 µg) wurden mit 40 µl [96% (v/v) Formamid; 20 mM EDTA; 1 mg/ml Bromphenolblau] versetzt und zur Denaturierung 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Proben in die Geltaschen des 15 % Polyacrylamid-Harnstoff-Gels geladen.

Als Größenstandard zur Bestimmung der Position von 21 nt siRNAs diente der micro RNA Marker (17, 21 und 25 nt) der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA).

Die Elektrophorese erfolgte mit dem Biometra Whatman Gelelektrophoresesystem (Modell V15-V17, Gelgröße circa 20 cm x 15 cm, Dicke 1,5 mm; Glasplatten: „V15-V17“, Kamm mit zwölf Zähnen von 10 mm Breite und 1,5 mm Dicke) in 0,225 x TBE. Nach der erfolgten Polymerisation über Nacht wurden die denaturierten Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 75 min bei 800 V, 25 mA und 10 Watt, bis die Bromphenolblau-Bande die Unterkante des Gels erreicht hatte. Die RNA im Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,5 x TBE, 1 µg/ml Ethidiumbromid) gefärbt und unter UV-Durchlicht visualisiert und dokumentiert.

Der Transfer der siRNA auf Zeta-Probe GT Membran (Bio-Rad) mittels Elektrotransfer erfolgte mit der Blotapparatur Bio-Rad Trans Blot der Firma Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers. Die siRNAs wurden durch zwei Stunden Inkubation bei 80°C unter Vakuum auf der Membran fixiert.

Die Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden erfolgte durch *in vitro* Transkription nach Mette *et al.* (2005). Es wurden 2,5 µl geschnittene Plasmid-DNA (1 µg/µl), 10,0 µl *in vitro* Transkriptions-Puffer (5x, Fermentas, St. Leon Rot), 3,75 µl ATP; CTP; GTP (6,6 mM); 2,5 µl DTT (0,2 M), 25,0 µl [α -³²P]-UTP (250 µCi, Hartmann SRP210, Braunschweig), 3,75 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 2,5 µl T7 RNA-Polymerase (20 U/µl, Fermentas, St. Leon Rot) gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5,0 µl DNase I, *RNase-free* (10 U/µl) und erneute Inkubation bei 37°C für 5 min. Danach wurden 750 µl (120 mM Na₂CO₃ / 80 mM NaHCO₃) hinzugefügt und die Lösung wurde für 2,5 bis 3 h

bei 60°C inkubiert, um die markierte RNA zu fragmentieren. Abschließend erfolgte zur Neutralisation die Zugabe von 50 µl NaAcetat (3 M, pH 5,0).

Zur Vorbehandlung wurde die Membran in 40 ml Hybridisierungspuffer [7 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Formamid, 250 mM NaCl; 125 mM Na₂H₂PO₄ (pH 7,2)] im offenen Kunststoffbeutel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 42°C für ca. 4 bis 5 Stunden inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer erneuert (40 ml) und die ³²P-markierte, fragmentierte RNA-Sonde wurde zugegeben. Der Beutel wurde verschlossen und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C.

Die Membranen wurden zweimal 30 min mit 2 x SSC; 0,2 (w/v) SDS bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Exposition von Röntgenfilmen Bio Max (Kodak Industrie, Cedex, Frankreich) erfolgte in einer Verstärkerkassette bei -80°C für 2 bis 3 Tage.

Bei starkem Hintergrundsignal wurden die Membranen mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 60 mM NaCl und 10 µg/ml RNaseA für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Membranen bei Raumtemperatur in 50 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7,2 gewaschen und die Exposition von Röntgenfilm Bio Max (Kodak Industrie, Cedex, Frankreich) erfolgte erneut bei -80°C für ca. 14 Tage.

B.2.9 β-Glucuronidase Expressions- und Aktivitätstest in *A. thaliana*

Histochemischer β-Glucuronidase Expressionstest

Zum histochemischen Nachweis der β-Glucuronidase Expression in Blattstücken nach Sessions und Yanofsky (1999) wurden kleine (Ø circa 5 mm) Blattstücke in die Vertiefungen von 96er Mikrottestplatten überführt. Die Blattstücke in den Mikrottestplatten wurden mit 100 µl X-Gluc-Lösung (Tab. B-10) überschichtet und bei Raumtemperatur für 2 h im Exsikkator unter Vakuum infiltriert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die X-Gluc-Lösung entfernt und die Blattstücke mehrmals mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.

Tabelle B-10: Puffer für den histochemischen β-Glucuronidase Expressionstest.

Lösung	Komponenten
X-Gluc-Lösung	100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) 20 % (v/v) Methanol 0,3 % (v/v) Triton X 100 0,5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 0,5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mg/ml X-Gluc

Quantitativer β -Glucuronidase Aktivitätstest

Der quantitative β -Glucuronidase Aktivitätstest erfolgte nach Jefferson *et al.* (1987). Dieser Test ermittelt die β -Glucuronidase Expression über die Fähigkeit des *GUS*-Proteins, das nicht-fluoreszierende Substrat 4-MUG (4 Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid-Trihydrat) zu 4-MU (4-Methylumbelliferon) umzusetzen. 4-MU fluoresziert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 360 nm und emittiert bei 460 nm.

Durch Messung der Fluoreszenz bei 460 nm nach definierter Inkubationsdauer der Messlösung mit dem Blattextrakt kann die Umsatzrate von 4-MUG zu 4-MU und damit die β -Glucuronidase Aktivität quantitativ erfasst werden. Hierfür wurde Blattmaterial von *A. thaliana* in jeweils 1 ml GUS-Extraktionspuffer (Tab. B-11) homogenisiert.

Tabelle B-11: GUS-Extraktionspuffer für den quantitativen β -Glucuronidase Aktivitätstest.

Lösung	Komponenten
GUS-Extraktionspuffer	50mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0
	10mM EDTA, pH 8,0
	0,1 % N-Lauroylsarkosin-Na-Salz (Sarkosyl)
	0,1 % Triton X-100
	vor Gebrauch 0,07 % β -Mercaptoethanol zugeben

Nach Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurden 2,5 μ l des Blattextraktes mit 147,5 μ l GUS-Extraktionspuffer (Tab. B-11) und 50 μ l 4-MUG-Lösung [GUS-Extraktionspuffer mit 1,63 g/l 4 Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid-Trihydrat (4-MUG), beide Lösungen bereits auf 37°C vorgewärmt] vermischt und für ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Vom Reaktionsansatz wurden 50 μ l abgenommen und in 950 μ l 0,2 M Na_2CO_3 (Stopp-Lösung) gegeben (erste Messprobe, „Nullwert“), wodurch die Umsetzung sofort unterbrochen wurde. Der restliche Reaktionsansatz wurde weiter bei 37°C inkubiert, wobei die weitere Umsetzung von 4-MUG zu 4-MU proportional zur vorhandenen GUS-Aktivität erfolgte. Nach exakt 20 Minuten wurden wieder 50 μ l abgenommen und in 950 μ l 0,2 M Na_2CO_3 (Stopp-Lösung) gegeben (zweite Messprobe, „Umsatz“). Die Bestimmung der Fluoreszenz in beiden Messproben erfolgte im Fluorimeter VersaFluor™ der Firma Bio-Rad bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm.

Die Eichgerade der Fluoreszenz wurde mit Konzentrationen von 50 nM bis 5 μ M 4-MU Verdünnung (4-MU Verdünnungsreihe im Anhang G, Tab. G-2) in 0,2 M Na_2CO_3 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm erstellt. Als Bezugswert für die Aktivitätsberechnung wurden 50 pmol 4-MU gemessen. Alle GUS-Aktivitäten wurden durch mindestens zwei unabhängige Messungen bestimmt.

Als Bezugsgröße für die Aktivität wurde der Gehalt an löslichem Protein im Blattextrakt verwendet. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mithilfe einer Probe (25 µl) des Blattextraktes in 975 µl 20 % (v/v) Bradford Reagenz der Firma Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers (Bradford 1976). Die Messung wurde bei OD₅₉₅ im Photometer der Firma Milton Roy durchgeführt. Eine Eichgerade wurde mit BSA in den Konzentrationen von 1 bis 20 µg/ml erstellt.

Die GUS-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$A_{\text{GUS}} [\text{relative Einheiten/mg Protein}] = \frac{\Delta F \times 50 \text{ pmol 4-MU}}{T [\text{min}] \times \text{Protein} [\text{mg}] \times F_{50 \text{ pmol 4-MU}}}$$

mit ΔF : Differenz der Fluoreszenz zu Beginn der Reaktion (Nullwert) und am Ende (Umsatz)

T: Dauer der Reaktion in Minuten [min]

B.2.10 Bestimmung der relativen GFP-Fluoreszenz in *H. vulgare*

Optischer Nachweis der GFP-Fluoreszenz

Der optische Nachweis der GFP-Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluoreszenzstereomikroskop Leica MZ FL III der Firma Leica Microsystem GmbH (Wetzlar). Das Fluoreszenzstereomikroskop war mit zwei Filtersätzen ausgestattet:

GFP 2 (plus)	Erregerfilter/nm 480	Sperrfilter/nm: 510
GFP 3	Erregerfilter/nm:470/40	Sperrfilter/nm:525/50

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der digitalen Kamera „Carl Zeiss AxioCam HRc 12 V“, die Auswertung erfolgte mit der „Axio Version 3.0 Software“ der Firma Carl Zeiss Jena GmbH.

Ermittlung der GFP Fluoreszenz

Die quantitative Bestimmung der relativen GFP-Fluoreszenz erfolgte an frischen Gerstenkörnern im Stadium der Teigreife und der Reife sowie an reifen Körnern, die befeuchtet für ca. 24 h bei 4°C inkubiert wurden. Pro homozygoter transgener Linie wurden je 12 bis 20 Körner einzeln mit Mörsern zerkleinert (siehe Ergebnisteil Abb. C.32). Das homogenisierte Kornmaterial wurde bis zur Messung trocken bei 4°C gelagert und erst am

Messtag mit 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0 versetzt. Nach Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation wurden je zwei Proben des Überstandes zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Diese erfolgte mit Bradford-Reagenz gemäß der Angaben des Herstellers (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die Messung wurde bei OD₅₉₅ im Photometer der Firma Milton Roy durchgeführt. Eine Eichgerade wurde mit BSA in den Konzentrationen von 1 bis 20 µg/ml ermittelt.

Je zwei weitere Proben des Überstandes wurden 1 zu 10 mit 1 M Tris/HCl, pH 8,0 verdünnt. Unter Anregung bei 480 nm wurde die emittierte Fluoreszenz bei 510 nm im Fluorimeter VersaFluor™ der Firma Bio-Rad gemessen. Als Nullpunkt für alle Messungen diente die für 1 M Tris/HCl, pH 8,0 gemessene Eigenfluoreszenz des Extraktionspuffers. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen Messungen an verschiedenen Zeitpunkten wurde eine GFP-Standardkurve erstellt. Hierfür wurde rekombinantes GFP-Protein (recombinant EGFP; MoBiTec GmbH, Göttingen) verwendet. Die Eichgerade wurde mit GFP in den Konzentrationen von 0,075 bis 1 µg/ml bei einer Anregungswelle von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm im Fluorimeter erstellt. Als Referenzwert für die Berechnung der GFP-Konzentration wurde der für 0,5 µg/ml rekombinantes GFP gemessene Fluoreszenzwert verwendet.

Für jede untersuchte Linie wurde diese Messung zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, sodass sich ebenfalls vier Messwerte ergaben (vgl. quantitativer GUS-Aktivitätstest Abschnitt B.2.9).

Die GFP-Fluoreszenz wurde mit folgender Formel berechnet:

GFP-Fluoreszenz [relative Einheiten/mg Protein]=

$$10^3 \times m_1 \times F \times E_{480}$$

$$D \times A \times (OD_{595} - b_1)$$

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

B.2.11 Statistische Auswertungen

Die statistische Signifikanz im quantitativen β -Glucuronidase Aktivitätstest, histochemischen GUS-Expressionstest in *A. thaliana* und in der quantitativen GFP-Fluoreszenz-Bestimmung in *H. vulgare* wurden mit dem „Studentischen t-Test nach einfaktorieller Varianzanalyse“ im Programm SigmaStat® 3.1 überprüft. Die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzschwellen $\alpha = 0,05$).

B.2.12 Datenbankanalysen

Die Suche von homologen Sequenzen wurde mit der Funktion „BLAST“ in der Datenbank „*The Arabidopsis Information Resource*“ (<http://arabidopsis.org>) durchgeführt. Für die Suche wurde die Option „GenBank“ verwendet, die alle Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* analysiert.

C Ergebnisse

C.1. Untersuchungen zum Mechanismus der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung in *Arabidopsis thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in *Arabidopsis thaliana* der Mechanismus der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung untersucht. Dabei sollte insbesondere die mögliche Beteiligung einzelner Mitglieder der RDR-Genfamilie geklärt werden.

C.1.1. Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung eines GUS Reportergens

Nach Schubert *et al.* (2004) setzt eine post-transkriptionelle Inaktivierung der Genexpression ein, wenn ein bestimmtes, für jedes Reporter-gen-Konstrukt spezifisches, Transkriptniveau überschritten wird. Die weite Varianz an unterschiedlichen Expressionsniveaus, die in voneinander unabhängigen transgenen Linien gefunden wird, kann zum großen Teil auf diese post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung (PTGS) zurückgeführt werden.

Die transgene Linie GUS 2xr 126 enthält eine einzelne Insertion eines T-DNA Konstrukts mit zwei Kopien eines pro35S-GUS-OCster Reportergens (Abb. C-1). Im homozygoten Zustand weisen transgene Pflanzen daher vier Kopien des pro35S-GUS Reportergens auf (4xGUS), im hemizygoten Zustand zwei Kopien (2xGUS).

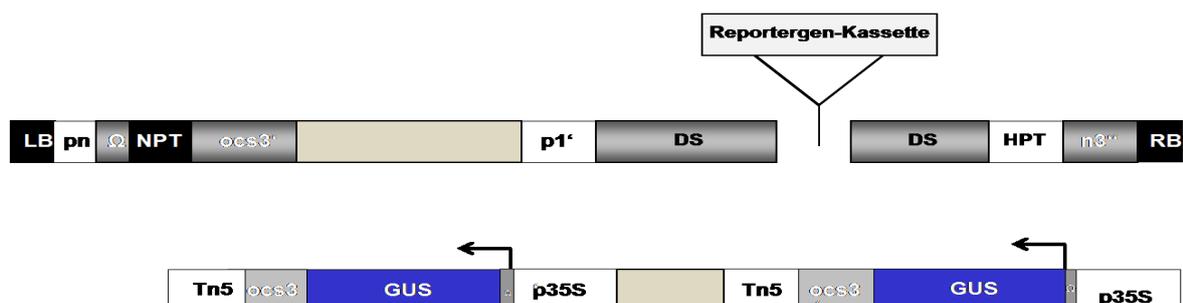


Abbildung C-1: T-DNA Konstrukt in *A. thaliana* Linie GUS 2xr 126 (Lechtenberg *et al.* 2003). Die der T-DNA Abschnitt in Vektors pMDL (Karte des Vektors gezeigt) enthielt als Resistenzmarker ein Neomycinphosphotransferasegen (*NPT*) unter der Kontrolle des Promoters des Nopalinsynthasegens (*pn*) und der 3'UTR des Octopinsynthasegens (*ocs3'*). Die Reporter-gen-Kassette GUS 2xr war in ein Ds-Element integriert, das zwischen einem p1' Promoter (aus dem Mannopinsynthasegen) und einem Hygromycinphosphotransferasegen (*HPT*) lag. Als histochemischer Reporter für die Transgenexpression diente ein β -Glucuronidasegen (*GUS*) unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters, der 5'UTR des Tabakmosaikvirus („omegaleader“, Ω) sowie der 3'UTR des Octopinsynthasegens (*ocs3'*). Im Anschluss an den 3'UTR folgte eine Sequenz aus dem Transposon 5 von *Escherichia coli* (*Tn5*). Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. LB = linke Randsequenz der T-DNA („left border“), RB = rechte Randsequenz der T-DNA („right border“), n3 ' = 3' UTR des Nopalinsynthasegens.

GUS-Expression in *A. thaliana* mit 2 und 4 Kopien eines pro35S-GUS Reportergens

Zur Untersuchung der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung eines GUS Reportergens wurden an homozygoten GUS 2xr 126 (4xGUS) Pflanzen und hemizygoten GUS 2xr 126 (2xGUS) Pflanzen histochemische und quantitative β -Glucuronidase Aktivitätsanalysen durchgeführt.

Die Abb. C-2 zeigt die histochemischen Färbungen von ganzen 9 Wochen alten 4xGUS Pflanzen. Diese Pflanzen wiesen unterschiedliche Muster in der Verteilung der GUS-Aktivität auf, die sich den Gruppen „einheitlich geringe GUS-Aktivität“, eine „GUS-Expression in Pflanzenteilen“ oder eine „einheitlich hohe GUS-Expression“ zuordnen liessen. Dieser histochemische GUS-Expressionstest zu einem späten Entwicklungsstadium zeigt deutlich die Unterschiede zwischen „GUS positiven“ und „GUS negativen“ Pflanzen, aber nicht das zeitliche Einsetzen des PTGS.

Da die GUS-Expression bzw. Aktivität in Pflanzen, die PTGS aufwiesen, nicht gleichmäßig verteilt ist, wurden zwei verschiedene Methoden entworfen, um an einer möglichst großen Zahl von Pflanzen zeitliche und räumliche Unterschiede der GUS-Aktivität erfassen zu können.



**einheitlich geringe
GUS-Expression in
der Pflanze**



**GUS-Expression in
Pflanzenteilen**



**einheitlich hohe
GUS-Expression in
der Pflanze**

Abbildung C-2: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS Pflanzen. Der Test wurde an 12 individuellen 9 Wochen alten Pflanzen der 4xGUS Linie durchgeführt. Drei verschiedene Expressionsmuster sind anhand von typischen Beispiel-Pflanzen dargestellt: „einheitlich geringe GUS-Expression“, „GUS-Expression in Pflanzenteilen“ sowie „einheitlich hohe GUS-Expression“.

Die Abb. C-3 stellt die Vorgehensweise bei der Probenahme für den quantitativen GUS-Aktivitätstest und den histochemischen GUS-Expressionstest dar.

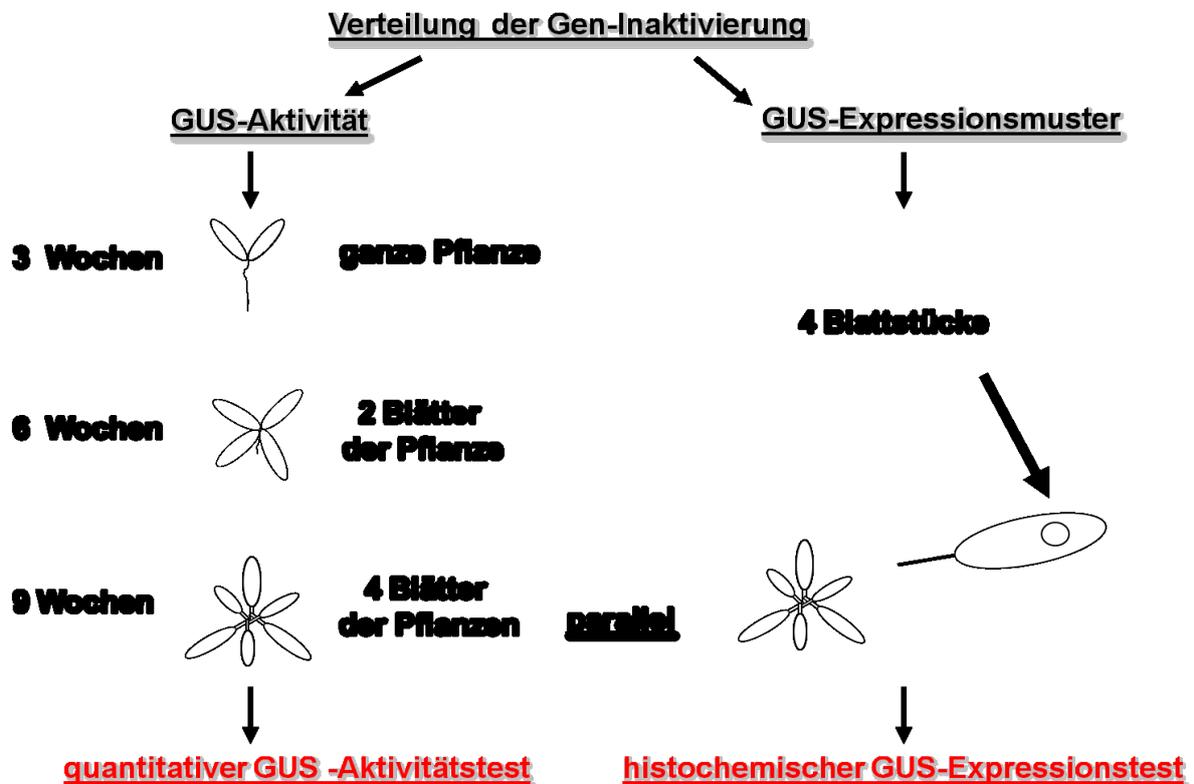


Abbildung C-3: Probenahme für die quantitativen GUS-Aktivitätstests und den histochemischen GUS-Expressionstest für die Untersuchungen zur „Verteilung der Gen-Inaktivierung“. Quantitative GUS-Aktivitätstests wurden nach 3, 6 und 9 Wochen durchgeführt. Darüber hinaus wurde parallel am Zeitpunkt 9 Wochen der histochemische GUS-Expressionstest angewendet.

Der quantitative GUS-Aktivitätstest erfolgte 3, 6 und 9 Wochen nach Auslegen der Samen in Erde an je 24 individuellen 2xGUS und 4xGUS Pflanzen. 9 Wochen nach dem Auslegen wurde zusätzlich der histochemische GUS-Expressionstest durchgeführt.

Die Ergebnisse des quantitativen GUS-Aktivitätstests der transgenen Pflanzen 2xGUS und 4xGUS im Vergleich zu nicht transgenen Pflanzen der Akzession Col-0 wurden in der Abb. C-4 dargestellt.

Die GUS-Aktivität von 2xGUS war konsistent zu jedem Mess-Zeitpunkt signifikant ($P < 0,05$) höher als in 4xGUS Pflanzen.

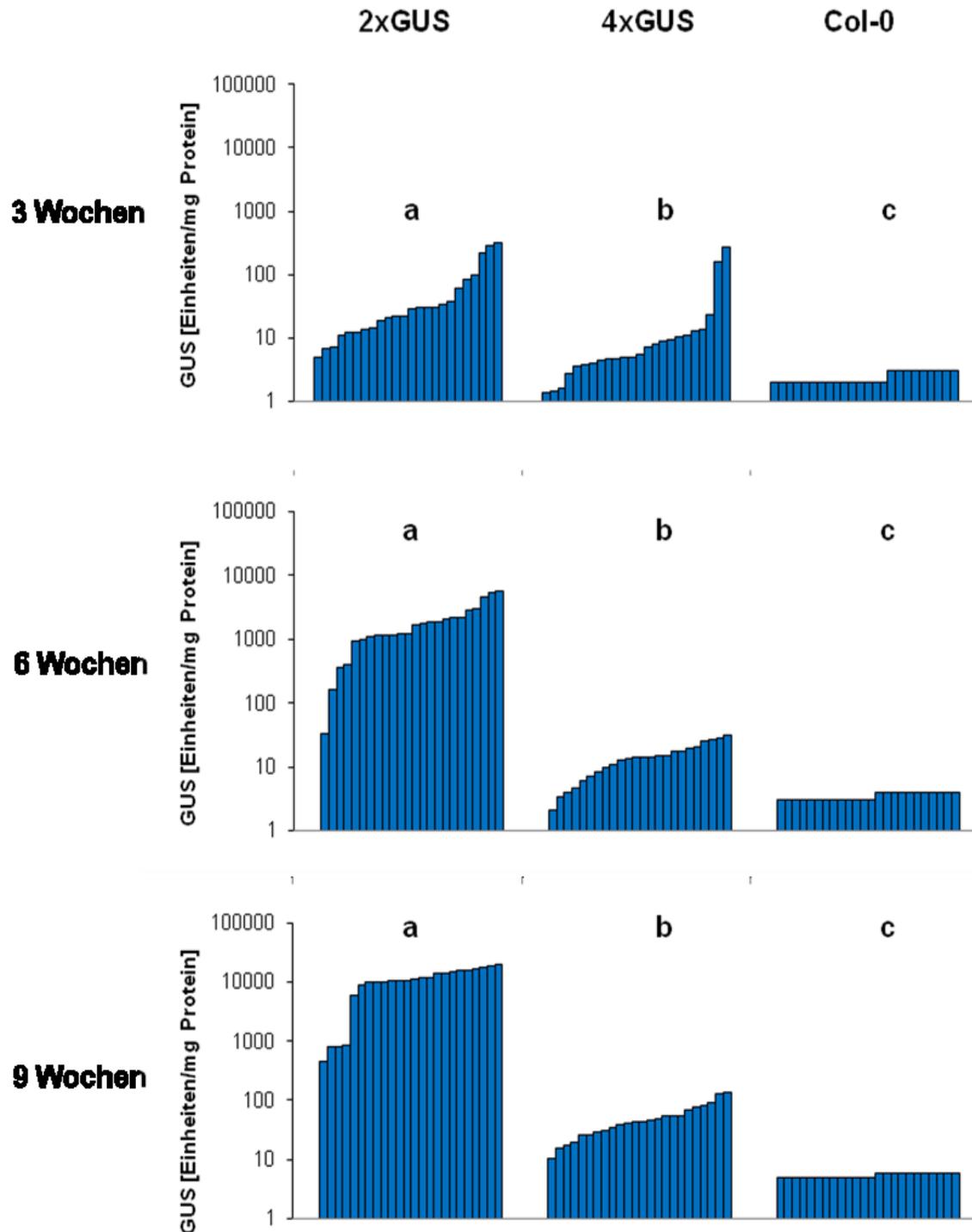


Abbildung C-4: Vergleich der GUS-Aktivität von 2xGUS, 4xGUS und nicht transgenen Col-0 Pflanzen. Die quantitative Messung der GUS-Aktivität bezogen auf lösliches Protein erfolgte nach 3, 6 und 9 Wochen. Die Säulen stellen Werte von je 24 2xGUS, 4xGUS und nicht transgenen Col-0 Pflanzen dar. Die GUS-Aktivität ist auf einer logarithmischen Skala abgebildet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Messwertgruppen ($P < 0,05$).

Das heißt, in 4xGUS Pflanzen zeigte sich PTGS der GUS-Expression. Die GUS-Aktivität in 9 Wochen alten 2xGUS Pflanzen war um das 1000-fache höher als die in gleich alten 4xGUS Pflanzen.

Zur Erfassung der räumlichen Verteilung des PTGS der GUS-Expression innerhalb individueller Pflanzen wurde für 9 Wochen alte 2xGUS und 4xGUS Pflanze an je vier Blattstücken pro Pflanze ein histochemischer GUS-Expressionstest durchgeführt (Abb. C-5).

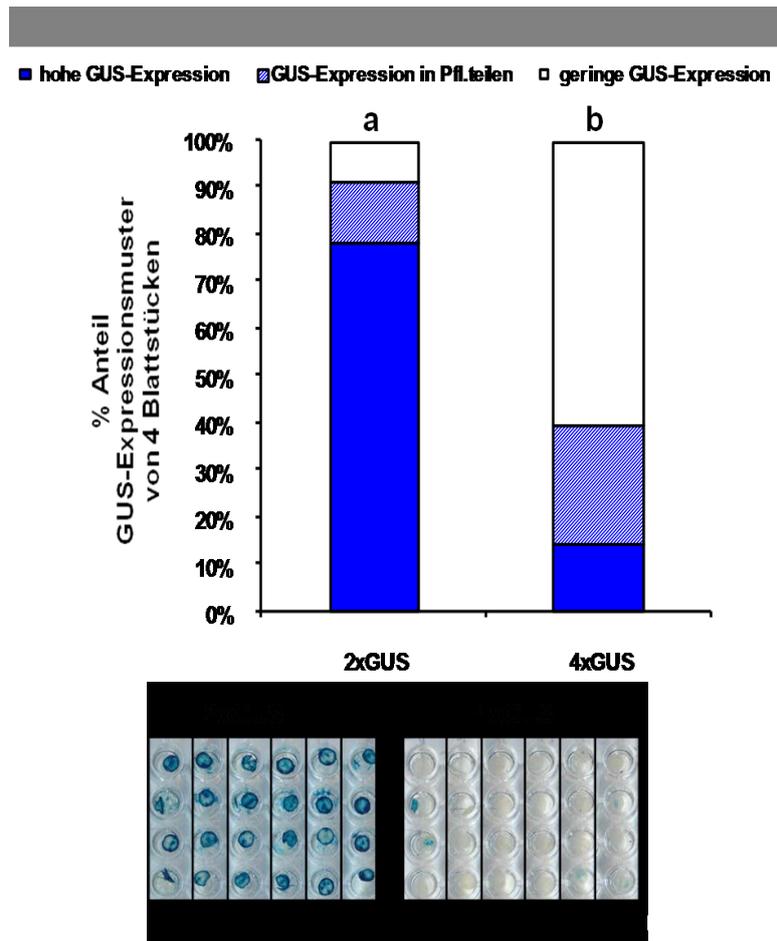


Abbildung C-5: Histochemischer GUS-Expressionstest von 2xGUS und 4xGUS Pflanzen nach 9 Wochen. Der histochemische GUS-Expressionstest erfolgte an je vier Blattstücken pro Pflanze von je 24 9 Wochen alten 2xGUS und 4xGUS Pflanzen. Deutliche Blaufärbung wurde als Anzeichen hoher GUS-Expression bzw. „GUS positiv“, keine Blaufärbung als Anzeichen für geringe GUS-Expression bzw. „GUS negativ“ interpretiert. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Testgruppen ($P < 0,05$).

Der Test ergab deutlich mehr „GUS positive“ 2xGUS Pflanzen (75 %) als „GUS positive“ 4xGUS Pflanzen (17 %). Innerhalb der 4xGUS Pflanzen zeigte sich auch besonders die ungleichmäßige Verteilung des PTGS, 17 % der 4xGUS Pflanzen wiesen GUS-Expression in Pflanzenteilen auf. Der größte Anteil der 4xGUS Pflanzen (66 %) zeigte jedoch eine einheitlich geringe GUS-Expression.

2xGUS Pflanzen wiesen deutlich häufiger als 4xGUS Pflanzen eine hohe GUS-Expression auf. Es konnten auch hier Pflanzen mit GUS-Aktivität in Pflanzenteilen (9 %) und Pflanzen mit einheitlich geringer GUS-Expression (17 %) beobachtet werden, aber ihr Anteil war wesentlich geringer als unter 4xGUS Pflanzen.

Beide GUS-Aktivitätstests zeigten somit übereinstimmend, dass die 4xGUS Pflanzen im Vergleich zu den 2xGUS Pflanzen eine geringere Expression des GUS Reportergens aufwiesen.

SiRNAs mit Homologie zur kodierenden Sequenz eines Gens sind ein gutes Indiz für die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung. Die Northern-Analyse einer Präparation von kleinen RNAs aus einer 4xGUS Pflanze zeigte ein klares Signal von 21 nt GUS siRNAs in *antisense*-Orientierung. Dieser Befund stützt die Annahme, dass die beobachtete GUS Inaktivierung aufgrund von PTGS erfolgt (Abb. C-6, Teilbild B).

Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen DNA Methylierung an transkribierten Sequenzen (hier GUS-Reportergen) und PTGS angenommen (Matzke und Birchler 2005). Eine Southern Analyse unter Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen belegte die deutliche Erhöhung der DNA Methylierung im 3' Bereich des GUS Reportergens in 4xGUS Pflanzen im Vergleich zu 2xGUS Pflanzen (Abb. C-6 Teilbild C).

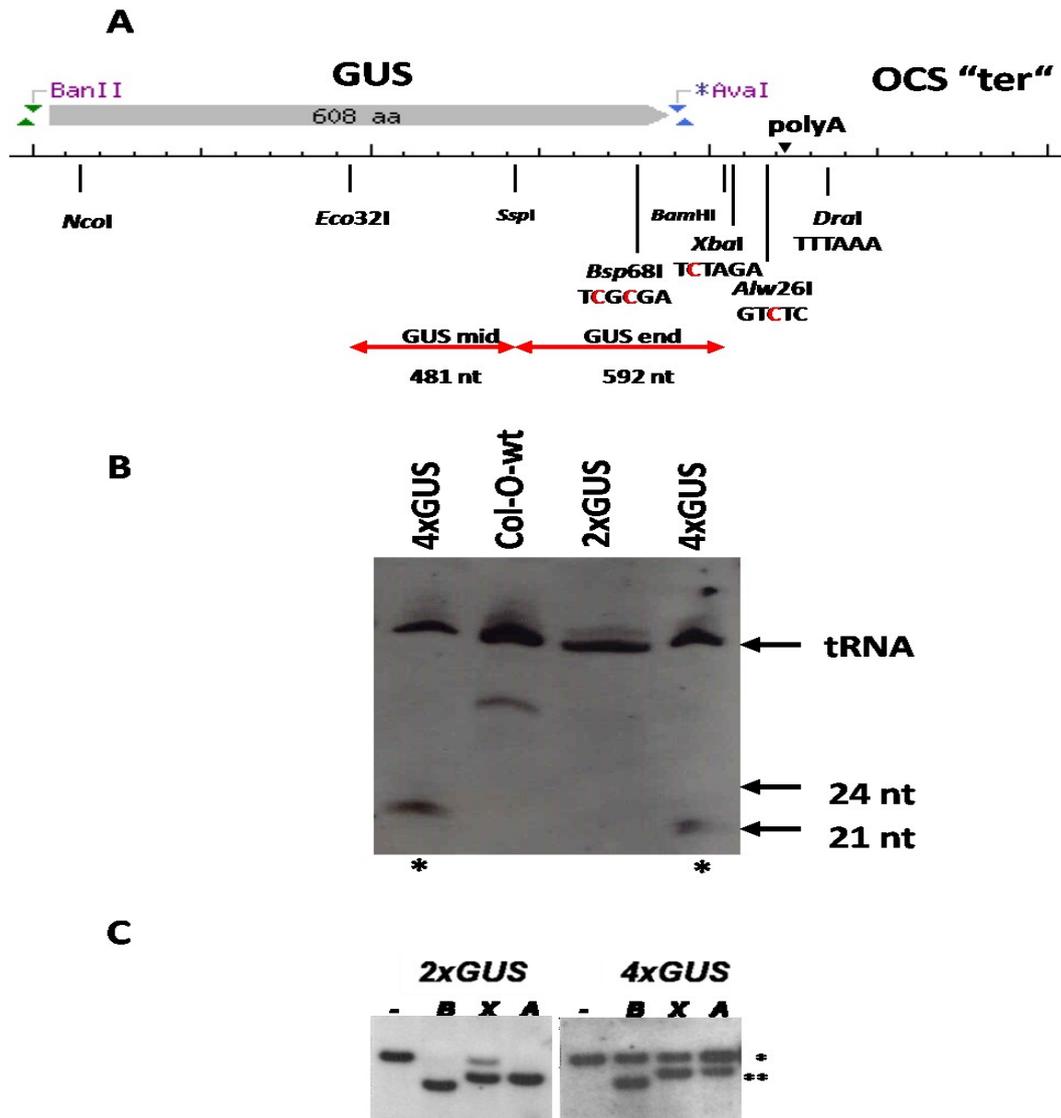


Abbildung C-6: SiRNA - und DNA Methylierungsanalyse. **A** Restriktionskarte des 3' Bereichs des GUS Reportergens in Linie GUS 2xr 126 mit den Zielsequenzen der verwendeten Hybridisierungssonden und den Schnittstellen der im Southern eingesetzten methylierungssensitiven Restriktionsenzyme. **B** Die Northern-Analyse wurde mit siRNA-Präparationen aus 9 Wochen alten 2xGUS, 4xGUS und nicht transgenen Col-0 Pflanzen durchgeführt. Es wurden 10 µg einer für siRNA angereicherten RNA-Präparation auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit der „GUS 3 'end“ (592 nt) „sense“ Sonde hybridisiert. Die mit Sternen (*) markierten Fragmente stellen 21 nt große siRNAs dar. **C** Southern-Analyse mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Genomische DNA von 9 Wochen alten Pflanzen wurde mit den Cytosin-methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *Bsp68I*, *XbaI* und *Alw26I* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der „GUS mid“ Sonde (481 nt). Auf dem dargestellten Audiogramm wurden die Methylierung indizierenden Fragmente mit * und die fehlende Methylierung indizierenden Fragmente mit ** gekennzeichnet.

C.1.2 Rolle von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung

Für die revers-genetische Analyse wurden Linien verwendet, in denen einzelne RDR Gene nicht mehr funktionell sind. Als Quelle dienten T-DNA Insertionslinien der GABI-Kat und SAIL Kollektionen sowie EMS-induzierte Mutanten.

Ziel war es, den jeweiligen Effekt des Verlusts einer bestimmten RDR auf das Transkriptmengen-abhängige PTGS zu untersuchen.

Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien und der EMS Mutanten

In der Tabelle C-1 werden die insgesamt zehn für die funktionelle Charakterisierung näher in Betracht gezogenen T-DNA Insertionslinien und EMS Mutanten zusammengefasst.

Tabelle C-1: Mutanten-Allele. Aus der GABI-Kat Kollektion (Rosso *et al.* 2003, <http://www.gabi-kat.de>.) stammten alle mit „-gk“ gekennzeichneten Linien. Aus der SAIL Kollektion stammten die Linien *rdr2-1* (Daxinger-Clemens *et al.* 2009 und Xie *et al.* 2004) sowie *rdr5-sl*. Sie wurden wie *rdr6-11* (Peragine *et al.* 2004) und die EMS Mutanten *rdr6-13* und *rdr6-14* (Alonso *et al.* 2003) vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (Nottingham, GB) bezogen.

Gen	Mutanten-Allele/ Katalognummer	T-DNA Kopien (Segregationsverhältnis)	Lokalisation der T-DNA/ Mutation
RDR1 (At1g14790)	<i>rdr1-gk</i> (GABI-Kat_535H07)	3 (15:1)	Exon
RDR2 (At4g11130)	<i>rdr2-gk</i> (GABI-Kat_199A07)	1 (3:1)	5'UTR
	<i>rdr2-1</i> (SAIL_1277H08)	nicht bestimmt	Exon
RDR3 (At2g19910)	<i>rdr3-gk</i> (GABI-Kat_732C02)	1 (3:1)	Promotor
RDR4 (At2g19920)	<i>rdr4-gk</i> (GABI-Kat_652F02)	2 (15:1)	Exon
RDR5 (At2g19930)	<i>rdr5-gk</i> (GABI-Kat_790F11)	1 (3:1)	Exon
	<i>rdr5-sl</i> (SAIL_747F01)	nicht bestimmt	Exon
RDR6 (At3g49500)	<i>rdr6-11</i> (CS24285)	T-DNA (C⇒T, 805, nonsense)	Exon
	<i>rdr6-13</i> (CS24287)	EMS (G⇒A, 2597; missense)	Exon
	<i>rdr6-14</i> (CS24288)	EMS (G⇒A, 3539, nonsense)	Exon

Alle verwendeten T-DNA Insertionslinien und EMS Mutanten wurden unter Verwendung der Akzession Col-0 generiert.

T-DNA Insertionslinien der GABI-Kat Kollektion

Die T-DNA Insertionslinien aus der GABI-Kat Kollektion enthalten die T-DNA der Vektoren pAC161 (*rdr1-gk*, *rdr2-gk*, *rdr4-gk* und *rdr5-gk*) bzw. pGABI1 (*rdr3-gk*).

T₂-Samen wurden auf Sulfadiazin-haltigem Medium ausgelegt, das eine Selektion auf Präsenz der T-DNA von pAC161 und pGABI1 ermöglicht. Das Verhältnis von resistenten und sensitiven Pflanzen wurde bestimmt. Ein Verhältnis von 3:1 von resistenten zu sensitiven Pflanzen deutete auf die Integration des Resistenzmarkers an einem genetischen Locus hin. In diesem Fall sind unter den resistenten Pflanzen im Bezug auf die T-DNA homozygote und hemizygot Pflanzen in Verhältnis 1:2 zu erwarten.

Für je 24 Sulfadiazin-resistente T₂ Pflanzen wurde der Status der T-DNA Insertion durch PCR bestimmt. Pflanzen, bei denen nur das T-DNA-spezifische PCR-Produkt beobachtet wurde, wurden als homozygot für das nicht-funktionelle Allel (*rdr*) betrachtet. Die Pflanzen, die zusätzlich ein für das intakte RDR-Allel spezifisches PCR-Produkt aufwiesen, wurden als im Bezug auf die T-DNA-Insertion hemizygot (*RDR/rdr*) betrachtet.

T₃ Nachkommen homozygoter T₂ Pflanzen wurden mit Hilfe der Southern Analyse auf die Zahl der integrierten T-DNA Kopien hin untersucht. In Abbildung C-7 (Teilbild C) sind die T-DNA des Vektors pAC161 und die von den für die Hybridisierung verwendeten „LB“ und „RB“ Sonden (linke und rechte Grenze der T-DNA) abgedeckten Bereiche dargestellt. Die Tabelle C-1 zeigt die eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Southern Analyse.

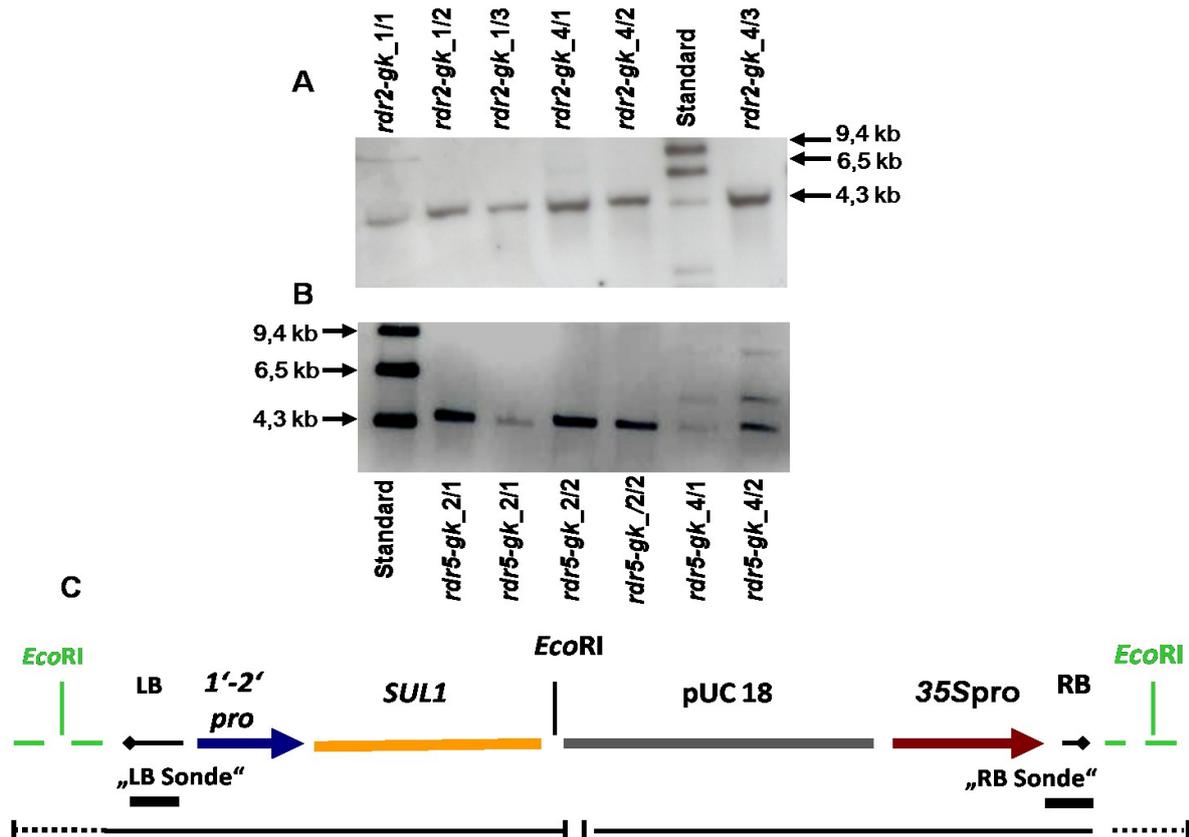


Abbildung C-7: Southern Analyse zur Bestimmung der T-DNA-Kopienzahl in *rdr2-gk* und *rdr5-gk* Pflanzen. **A** und **B** Pro Linie wurde genomische DNA von drei individuellen Pflanzen mit *EcoRI* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer für Binärvektor pAC161 spezifischen DIG-markierten „LB-Sonde“. Als Längenstandard für die Fragmente wurde DIG-markierter DNA Marker III verwendet. Jede sichtbare „Bande“ indiziert eine T-DNA-Kopie im Genom der untersuchten Pflanzen. **C** Schematische Darstellung der T-DNA in Binärvektor pAC161 mit den von den Hybridisierungssonden „LB Sonde“ und „RB Sonde“ erkannten Bereichen. Enthalten ist ein 1'-2' Promotor (1'-2'pro), ein Sulfadiazinresistenzgen (*SUL1*), ein Klonierungsvektor pUC18 und ein CaMV 35S Promotor (35S pro). Abschnitte der linken (Left Border = LB) und rechten Grenzen (Right Border = RB) der T-DNA wurden zur Herstellung der Hybridisierungssonden verwendet. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI* liegt in der Mitte der T-DNA.

Die Mutante *rdr2-gk* hat eine T-DNA Insertion in der 5'UTR vor dem Exon 1 (251 bp vor dem Translationsstart-ATG) des *RDR2* Gens (At4g11130) auf Chromosom 4 (Abb. C-8). *AtSN1* DNA Methylierungsdaten zeigen für *rdr2-gk* (Abb. C-11) genauso wie für *rdr2-1* (Xie *et al.* 2004) eine deutliche Abnahme der RNA-abhängigen DNA Methylierung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass *rdr2-gk* ein nicht funktionelles Allel der *RDR2* darstellt.

Die T-DNA Insertion in *rdr5-gk* befindet sich im Exon 10 (2149 bp nach dem Translationsstart ATG) des *RDR5* Gens (At2g19930) auf Chromosom 2. Die Mutante *rdr5-gk* stellt mit großer Wahrscheinlichkeit ein nicht-funktionelles Allel dar, da kein funktionelles Transkript mehr gebildet werden kann (Abb. C-8). Abb. C-7 (Teilbild B) zeigt, dass in einigen

individuellen Pflanzen der *rdr5-gk* Linie mehr als eine T-DNA Kopie nachzuweisen war. Für alle folgenden Arbeiten wurden nur Nachkommen von den *rdr5-gk* Pflanzen verwendet, für die in der Southern Analyse die Anwesenheit von nur einer T-DNA Kopie gezeigt werden konnte.

Für keine der Linien aus der GABI-Kat Kollektion, die als Kandidaten für *rdr1*, *rdr3* und *rdr4* Mutanten untersucht wurden, konnten Nachkommen identifiziert werden, die nur einer T-DNA Kopie enthielten (Daten nicht gezeigt). Dieses Material wurde nicht weiter verwendet.

Bei Untersuchungen von Daxinger *et al.* (2008) wurde eine *in trans* wirkende Gen-Inaktivierung zwischen Transgenen mit pro35S-Sequenzen beobachtet. Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine transkriptionelle Inaktivierung der vorhandenen 35S Promotoren. Da sowohl die T-DNA Insertionslinien der GABI-Kat Kollektion als auch das als PTGS-Testsystem verwendete GUS 2xr 126 -Transgen den 35S-Promotor aufweisen, wurden zur Minimierung des Risikos von pro35S-spezifischen Interaktionen nur GABI-Kat Linien verwendet, die nur eine T-DNA Kopie (*rdr2-gk* und *rdr5-gk*) enthielten.

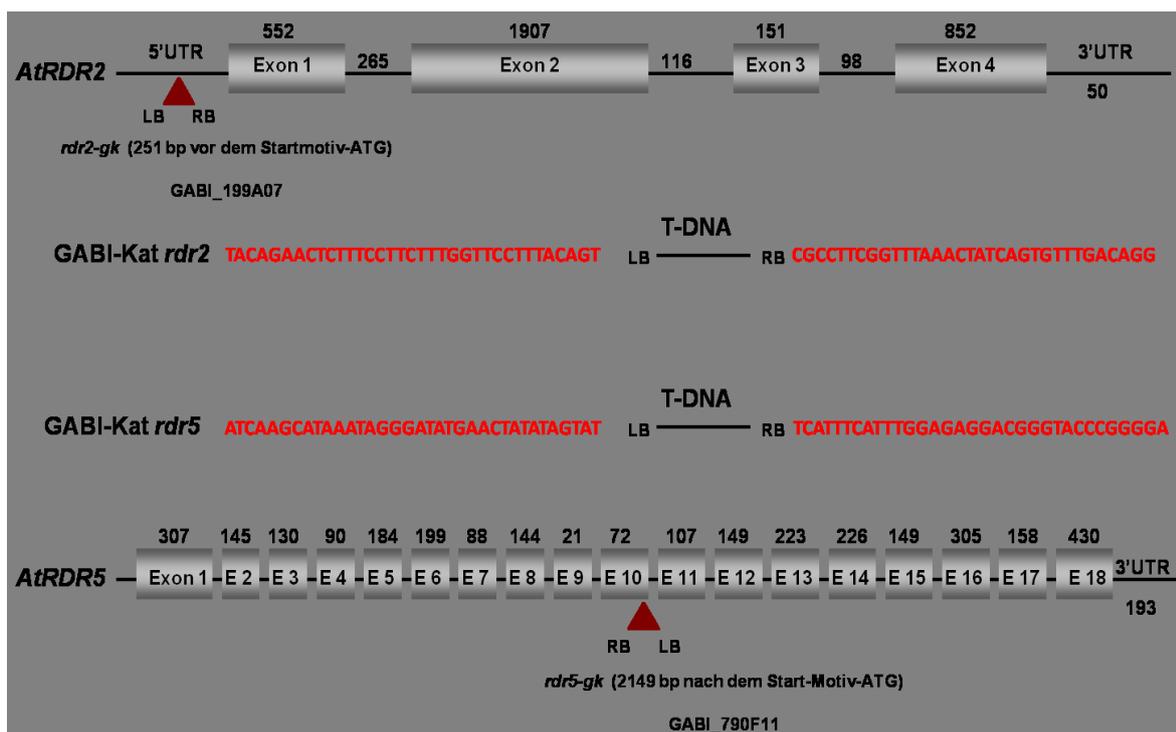


Abbildung C-8: Position der T-DNA Insertionen in GABI-Kat Linien *rdr2-gk* und *rdr5-gk*. Exons werden als graue Kästchen dargestellt. Die Werte oberhalb der Kästchen geben die Länge der Exons in bp an. Die UTRs und Introns werden als schwarze Linien dargestellt. Rote Dreiecke bezeichnen die Positionen der T-DNA Insertionen.

T-DNA Insertionslinien der SAIL Kollektion

Die T-DNA Insertionslinien *rdr2-1* (Daxinger-Clemens *et al.* 2009 und Xie *et al.* 2004) und *rdr5-sl* aus der SAIL Kollektion enthalten die T-DNA des Vektors pDAP101. Im Gegensatz zu den T-DNA Insertionslinien aus der GABI-Kat Kollektion weisen sie keinen 35S-Promotor auf (Gerola *et al.* 2000).

Die Mutante *rdr2-1* hat eine T-DNA Insertion im Exon 1 (316 bp nach dem Start-Motiv ATG) des *RDR2* Gens (At4g11130) auf Chromosom 4. Die Insertion resultiert in einem nicht-funktionellen *rdr2* Allel, da kein funktionelles Transkript gebildet werden kann (Abb. C-9).

Die T-DNA Insertion der Mutante *rdr5-gk* befindet sich im Exon 13 (3435 bp nach dem Translationsstart-ATG) des *RDR5* Gens (At2g19930) auf Chromosom 2 und resultiert ebenfalls in einem nicht-funktionellen *rdr5* Allel (Abb. C-9).

Die Genotypisierung der Pflanzen erfolgte per PCR, wobei fünf individuelle T₂-Pflanzen der Linie *rdr2-1* und 24 T₂-Pflanzen der Linie *rdr5-sl* getestet wurden. Wie bei den GABI-Kat-Linien wurden Pflanzen, bei denen nur das T-DNA-spezifische PCR-Produkt beobachtet wurde, als homozygot für das nicht-funktionelle Allel (*rdr*), und Pflanzen, die zusätzlich ein spezifisches PCR-Produkt für das RDR-Allel aufwiesen, als hemizygot für die T-DNA-Insertion (*RDR/rdr*) betrachtet. Sämtliche *rdr5-sl* Pflanzen erwiesen sich im Test als hemizygot.

Die homozygoten Pflanzen der Linie *rdr2-1* und die hemizygoten *rdr5-sl* Pflanzen wurden zum Einkreuzen in das Reportergensystem GUS 2xr 126 verwendet.

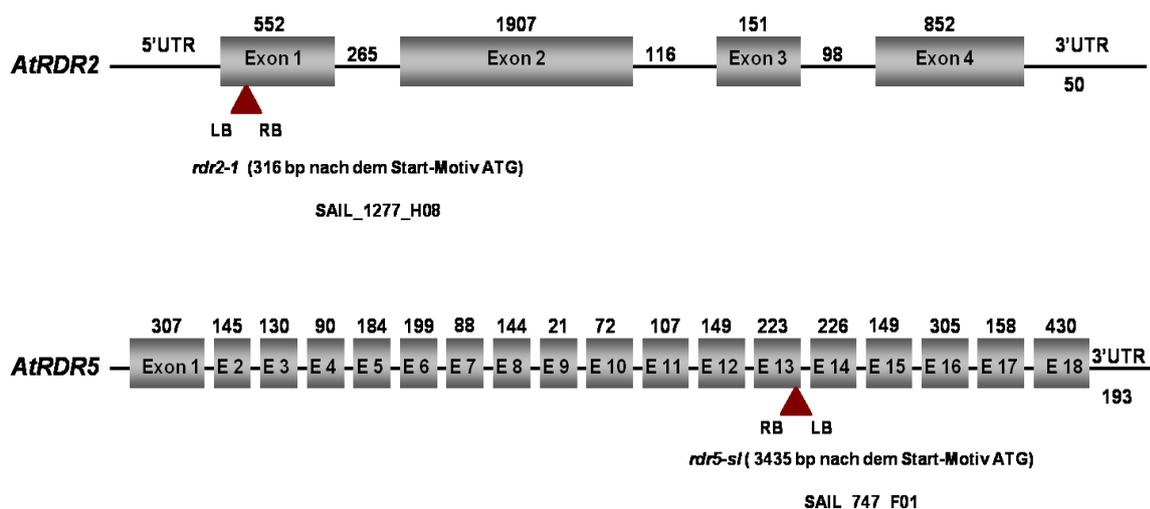


Abbildung C-9: Position der T-DNA Insertionen in SAIL Linien *rdr2-1* und *rdr5-sl*. Exons werden als graue Kästchen dargestellt. Die Werte oberhalb der Kästchen geben die Länge der Exons in bp an angegeben. Die UTRs und Introns werden als schwarze Linien dargestellt. Rote Dreiecke markieren die Positionen der T-DNA Insertionen.

Linien mit Punktmutationen in *RDR6*

Die Linie *rdr6-11* enthält eine Punktmutation (Abb. C-10) im vorderen Bereich des Exons 1 (805 bp nach dem Start-ATG Motiv) des *RDR6* Gens (At3g49500) auf Chromosom 3. Der Nachweis von Mutationen in den T₂-Pflanzen erfolgte mittels eines CAPS (*cleaved amplified polymorphic sites*) DNA-Markers unter Verwendung der in Tabelle B-7 angegebenen PCR-Primer (Peragine *et al.* 2004). Die PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonuklease *TaqI* geschnitten und zum Nachweis der allel-spezifischen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Pflanzen, bei denen nur das *rdr6-11*-spezifische PCR-Produkt (Fragmente von 80 und 107 bp) beobachtet wurde, wurden als homozygot für das nicht-funktionelle *rdr6-11* Allel betrachtet. Die Pflanzen, die zusätzlich ein für das *RDR6*-Allel spezifisches PCR-Produkt (Fragmente von 15, 80 und 92 bp) aufwiesen, wurden als heterozygot (*RDR6/rdr6-11*) betrachtet.

Darüber hinaus wurden die EMS-Mutanten *rdr6-13* und *rdr6-14* für die revers-genetischen Untersuchungen verwendet. Mutante *rdr6-13* weist eine Mutation im hinteren Bereich (Abb. C-10) des Exons 1 (2597 bp nach dem Translationsstart ATG) und Mutante *rdr6-14* im vorderen Bereich (Abb. C-10) des Exons 2 (3539 bp nach dem Start-ATG-Motiv) des *RDR6* Gens (At3g49500) auf.

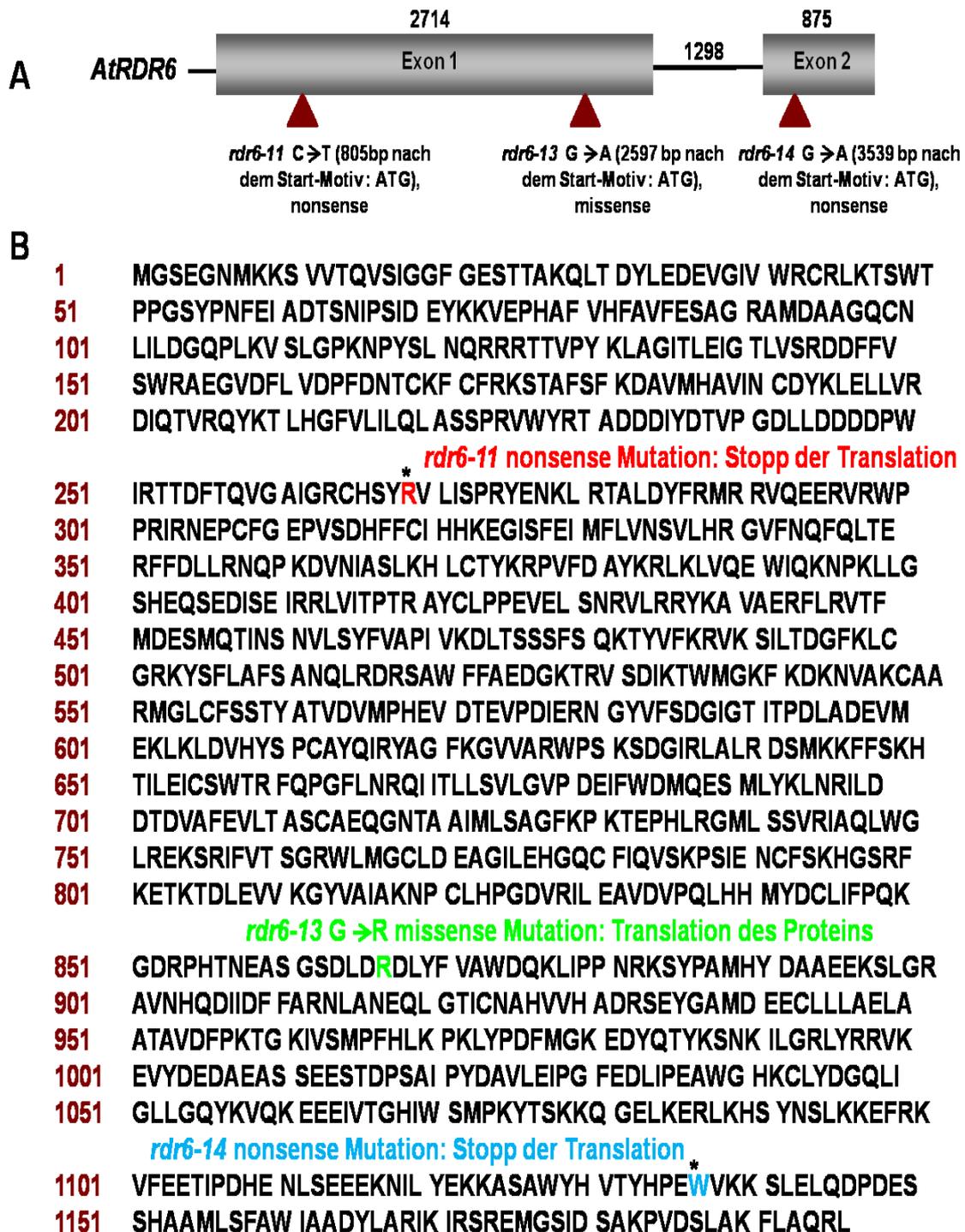


Abbildung C-10: Positionen der Punktmutationen in drei verschiedenen *rdr6* Allelen. A Exons werden als graue Kästchen dargestellt. Die Werte oberhalb der Kästchen geben die Länge der Exons in bp an. Die UTRs und Introns werden als schwarze Linien dargestellt. **B** Die resultierenden Änderungen in den codierten Aminosäuresequenzen sind für die Allele *rdr6-11*, *rdr6-13* und *rdr6-14* angegeben.

DNA-Methylierungsanalysen mittels Bisulfit Sequenzierung

In der Arbeitsgruppe Epigenetik wurde von Dr. Markus Kuhlmann die DNA-Methylierung des Transposons *AtSN1* in homozygoten *rdr2-gk*, *rdr5-gk*, *rdr6-11*, *rdr6-13* und *rdr6-14* Mutanten mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert (Abb. C-11). Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen der Akzession Col-0 konnten für die Mutanten *rdr2-1* und *rdr2-gk* eine deutliche Reduzierung der DNA-Methylierung insbesondere im CNN-Kontext festgestellt werden. Die anderen Mutanten zeigten nur geringfügigere Abweichungen.

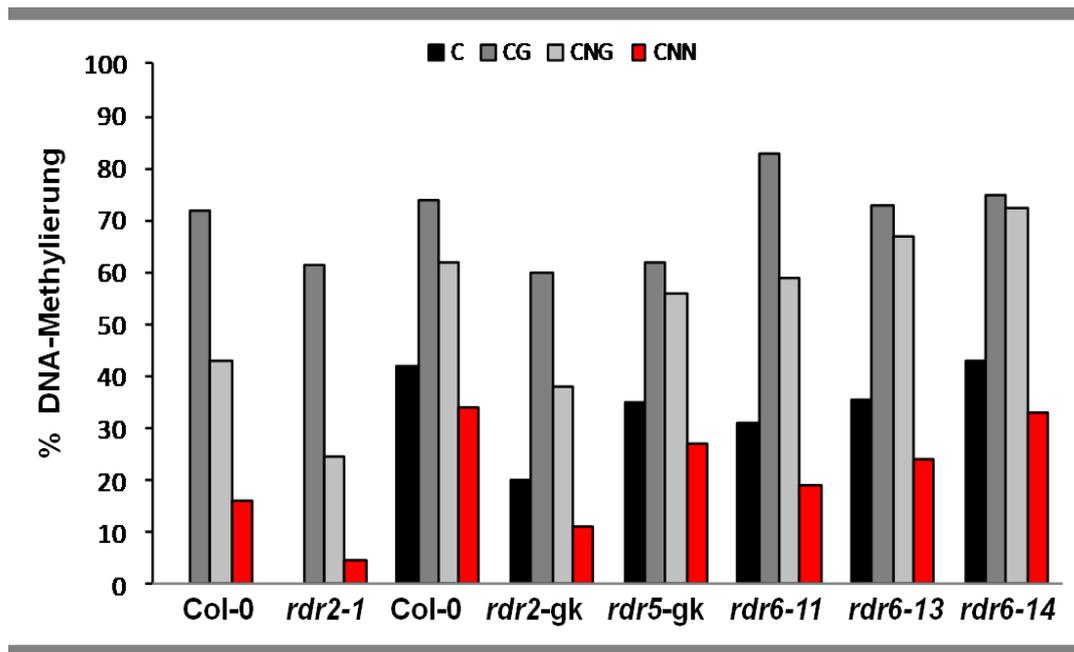


Abbildung C-11: Bisulfit-Sequenzierung der *AtSN1*-Region. DNA Methylierung von *AtSN1* in Wildtyp-Pflanzen der Akzession Col-0 (n=23) und in Mutanten *rdr2-1* (Xie *et al.* 2004, n=18), *rdr2-gk* (n=20), *rdr5-gk* (n=24), *rdr6-11* (n=17), *rdr6-13* (n=16) und *rdr6-14* (n=18) (Markus Kuhlmann, persönliche Mitteilung). Genomische DNA wurde mit dem Qiagen DNA Maxi Kit (Qiagen) aus Rosettenblättern extrahiert und mit dem Qiagen EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) behandelt. Dabei wurden nicht-methylierte Cytosine zu Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine unverändert blieben. *AtSN1*-spezifische Bereiche wurden durch PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Balken im Diagramm zeigen den Anteil methylierter Cytosine unter allen analysierten Cytosinen (schwarz) und den Cytosinen im CG Kontext (dunkelgrau), im CNG (N entspricht A, C, T) Kontext (hellgrau) oder CNN Kontext (rot).

Revers-genetische Untersuchungen zur Rolle der RNA-abhängigen-RNA-Polymerasen mittels Reportergensystem GUS 2xr 126

Durch Kombination von nicht-funktionellen *rdr2*, *rdr5* und *rdr6*-Allelen mit dem Reportertransgen GUS 2xr 126 wurden die Rollen von RDR2, RDR5 und RDR6 bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung in *A. thaliana* in einem revers-genetischer Ansatz untersucht.

Ziel der Kreuzungsarbeiten war es, Linien zu etablieren, in denen sowohl eines der mutierten *rdr*-Allele als auch das Reportertransgen GUS 2xr 126 (4xGUS) homozygot vorliegen (Abb. C-12). Homo- oder hemizygote *rdr*-Pflanzen wurden mit GUS 2xr 126 Pflanzen gekreuzt. Von F₁ Pflanzen, deren doppelt hemizygoter Status durch PCR bestätigt werden konnte, wurden durch Selbstung F₂ Nachkommen erhalten. Bei ungekoppelter Segregation der beteiligten Loci sind unter diesen F₂ Nachkommen die angestrebten doppelt homozygoten Pflanzen der Genotypen *rdr* 4xGUS und *RDR* 4xGUS mit je einer Häufigkeit von 1:15 zu erwarten.

Die Genotypisierung per PCR wurde an Gruppen von 24 bis 48 F₂ Pflanzen durchgeführt. Gegebenenfalls wurden die Samen durch Keimung auf Kanamycin-haltigem Medium auf die Anwesenheit der Reportergenkassette GUS 2xr 126 (*rdr6*-Mutanten) oder auf Kanamycin und Sulfadiazin-haltigem Medium (*rdr2-gk*, *rdr5-gk*) auf die Anwesenheit der Reportergenkassette GUS 2xr 126 und des T-DNA Vektors pAC161 selektiert. Das Verhältnis von resistenten und sensitiven Pflanzen wurde jeweils bestimmt.

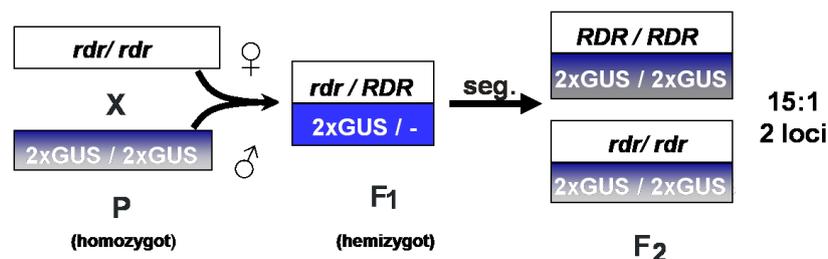


Abbildung C-12: Schema der Einkreuzung der nicht funktionellen Allele *rdr2-gk*, *rdr5-gk* und *rdr6*-Allelen in Linie GUS 2xr 126. Die hemizygote F₁ Generation wurde geselbstet. Unter den segregierenden F₂ Pflanzen wurden durch PCR doppelt homozygote *rdr* GUS und *RDR* GUS Individuen identifiziert.

Die Abb. C-13 stellt beispielhaft die Identifizierung von bezüglich GUS 2xr 126 und *rdr2-gk* doppelt homozygoten F₂ Pflanzen in einer segregierenden Population durch Genotypisierung mit vier verschiedenen Primer-Kombinationen (Tab. B-7) dar. Identifizierte homozygote F₂ Pflanzen wurden geselbstet. Die daraus resultierenden Nachkommen der F₃ Generation wurden für GUS-Expressionsanalysen sowie alle weiteren molekularen Arbeiten verwendet.

Parallel wurden für die funktionellen *RDR*-Allele homozygote Pflanzen aus der F_2 Populationen ebenfalls geselbstet und die resultierenden F_3 Nachkommen wurden bei allen Untersuchungen als Wildtyp-Kontrollen eingesetzt.

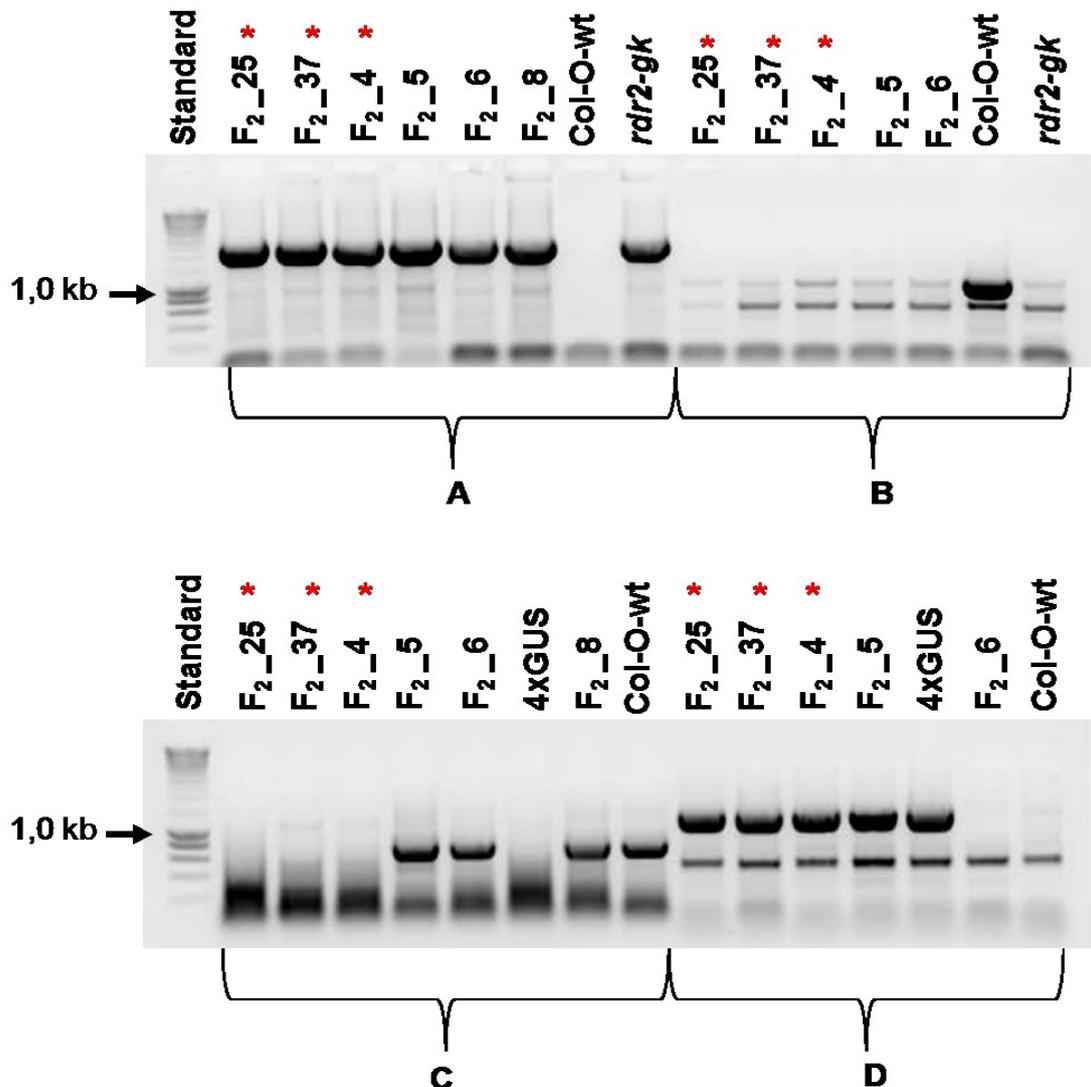


Abbildung C-13: Genotypisierungs-PCR der segregierenden F_2 Generation aus der Kreuzung von *rdr2-gk* und Linie GUS 2xr 126. Die vier unterschiedlichen Primerkombinationen werden in der Tabelle B-7 aufgeführt. **A:** LB r (08760) und *rdr2-gk* f, **B:** *rdr2-gk* f und *rdr2-gk* r, **C:** *chr1-3* f und *chr1-3* r, **D:** GUS f und GUS r. PCR Produkt A ist spezifisch für die T-DNA Insertion in *rdr2-gk*, Produkt B für das unveränderte *RDR2* Allel, Produkt C für den ursprünglichen Insertionsbereich vor der T-DNA Integration in GUS 2xr 126 und Produkt D für die T-DNA Insertion in GUS 2xr 126.

Die Genotypisierung erfolgte mithilfe von ko-dominanten PCR-Markern. Die PCRs A und D erfolgten mit Primern, von denen einer in der flankierenden genomischen DNA und einer in der T-DNA bindet. Ein Produkt entsteht nur, wenn ein Allel mit inserierter T-DNA vorhanden

ist. PCR B und C erfolgten mit Primern, die in der flankierenden genomischen DNA rechts und links der T-DNA binden. Ein Produkt entsteht nur (aufgrund seiner kürzeren Länge mit ausreichend Effizienz), wenn das ursprünglichen Allel ohne T-DNA Insertion als Substrat vorhanden ist. Für T-DNA Insertionsallel und GUS Reportertransgen doppelt homozygote Pflanzen zeigen die PCR-Produkte A und D, aber nicht B und C.

Transgenexpression in Abwesenheit einzelner RNA-abhängigen-RNA-Polymerasen mittels Reportergensystem (4xGUS *rdr*)

Es wurde untersucht, inwieweit der Verlust von *RDR2*, *RDR5* oder *RDR6* die Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung des GUS-Reportergens beeinflusst. Dazu wurden 4xGUS, 4xGUS *rdr2-gk*, 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen in Gruppen zu 24 zu verschiedenen Zeitpunkten im quantitativen GUS-Aktivitätstest sowie nach 9 Wochen im histochemischen GUS-Expressionstest analysiert (Abb. C-14).

Die GUS-Aktivität der 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen war im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen bei 9 Wochen alten Pflanzen um das 100 bis 1000-fache höher. Dieser Unterschied konnte auch als statistisch signifikant belegt werden ($P < 0,05$).

Die 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen wiesen innerhalb der gemessenen GUS-Aktivitätswerte zu allen Mess-Zeitpunkten eine starke Streuung auf. Nach 9 Wochen konnte eine 10 bis 1000-fache höhere GUS-Aktivität im Vergleich zu den 4xGUS Pflanzen festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Messwerten von 4xGUS *rdr2-gk* und 4xGUS Pflanzen waren ebenfalls statistisch signifikant ($P < 0,05$).

In Anbetracht der GUS-Aktivitätswerte ist bei den Linien 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* von einer deutlichen Verringerung des PTGS auszugehen. Die Linie 4xGUS *rdr2-gk* zeigte ebenfalls eine vermindertes PTGS, jedoch in geringerem Maß als die Linien 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11*.

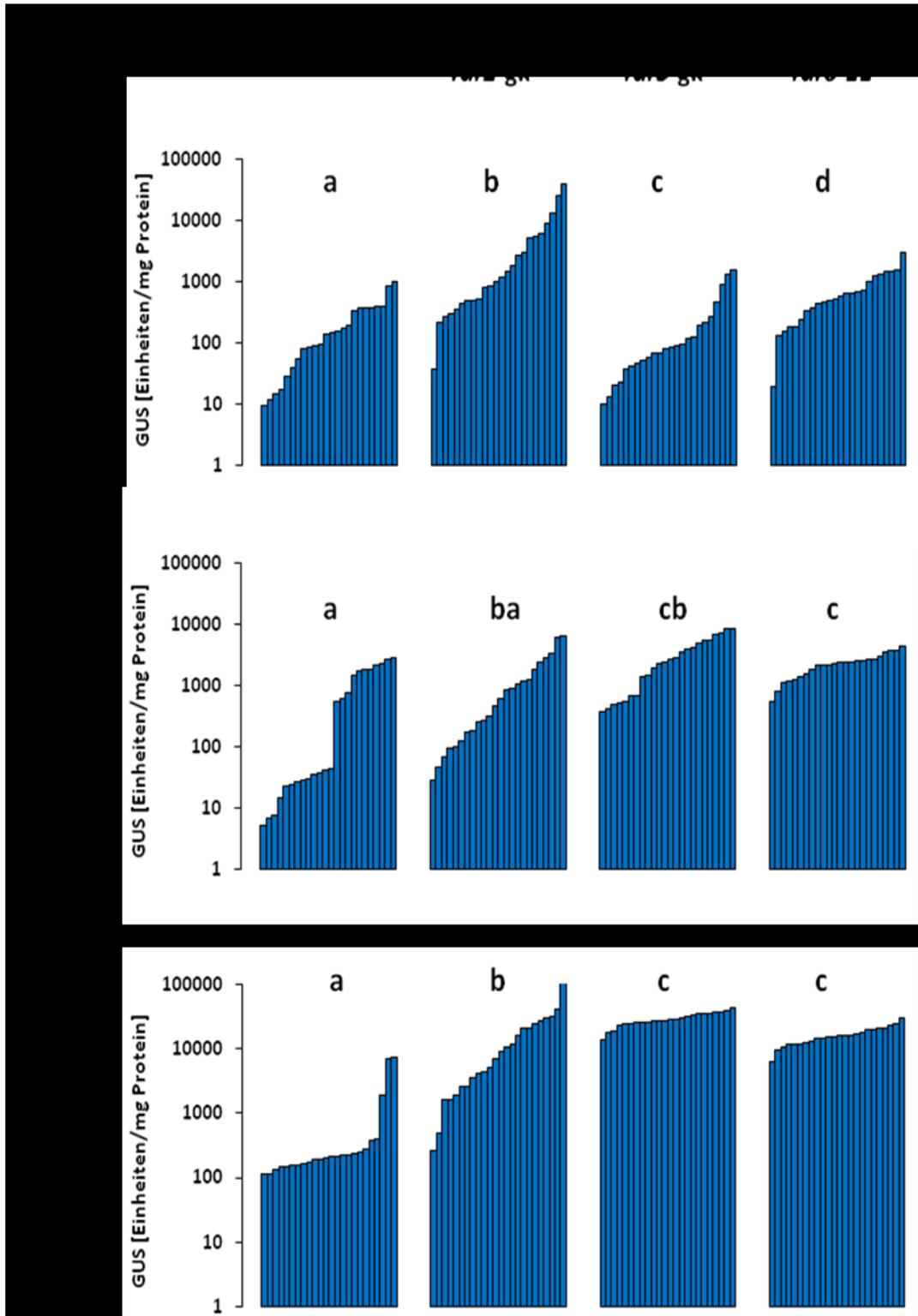


Abbildung C-14: Vergleich der GUS-Aktivität von 4xGUS und 4xGUS *rdr* Pflanzen. Die Messung erfolgte nach 3, 6 und 9 Wochen, die Messwerte von 24 Einzelpflanzen pro untersuchte Linie von 4xGUS, 4xGUS *rdr2-gk*, 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* sind dargestellt. Die GUS-Aktivitäten der einzelnen Pflanzen wurden auf einer logarithmischen Skala abgebildet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

Zur Beurteilung der räumlichen Verteilung des PTGS innerhalb der Pflanzen wurde ein histochemischer GUS-Expressionstest durchgeführt (Abb. C-15).

Pflanzen der Linie 4xGUS *rdr6-11* zeigten durchgängig eine einheitliche hohe GUS-Expression (100 %). Ähnliches wurde für Linie 4xGUS *rdr5-gk* beobachtet. Hier wurde aber daneben eine geringe Anzahl von Pflanzen gefunden, die eine einheitlich geringe GUS-Expression (8 %) bzw. GUS-Expression in Pflanzenteilen (4 %) aufwiesen. Für 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* konnten somit beide GUS-Bestimmungen eine deutliche Verringerung des PTGS zeigen.

Für 4xGUS *rdr2-gk* zeigte der histochemische Test eine große räumliche Variabilität der GUS-Expression innerhalb individueller Pflanzen, was auf eine hohe räumliche Streuung hinsichtlich des PTGS hinweist.

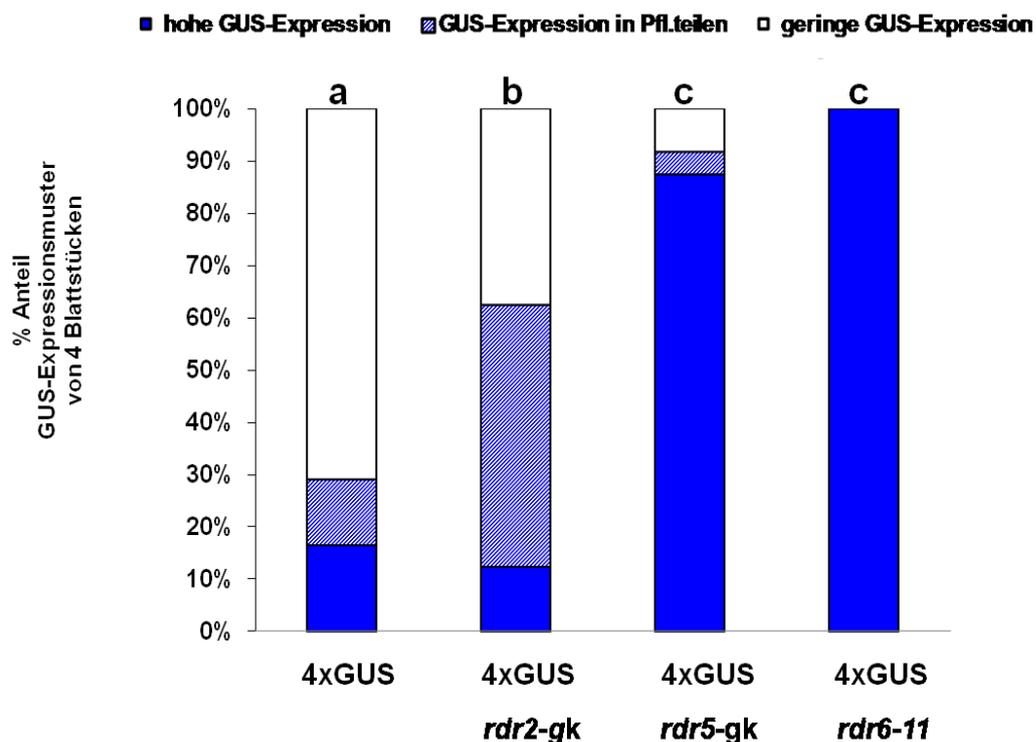


Abbildung C-15: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS und 4xGUS *rdr* Pflanzen nach 9 Wochen. Der histochemische GUS-Expressionstest erfolgte nach 9 Wochen an je vier Blattstücken pro Pflanze von je 24 4xGUS, 4xGUS *rdr2-gk*, 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen. Deutliche Blaufärbung wurde als Anzeichen hoher GUS-Expression bzw. „GUS positiv“ interpretiert, keine Blaufärbung als Anzeichen für geringe GUS-Expression bzw. „GUS negativ“. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

Mit Präparationen von kleinen RNAs aus 4xGUS, 4xGUS *rdr2-gk*, 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen wurden Northern Analysen durchgeführt. Nur 4xGUS und 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen zeigten klare Signale von GUS-abgeleiteten 21nt siRNAs in *antisense*-Orientierung (Abb. C-16).

In diesem exemplarischen Nachweis konnten siRNAs mit Homologie zur kodierenden Sequenz des GUS-Gens somit nur in den Linien (4xGUS und 4xGUS *rdr2-gk*) nachgewiesen werden, in denen auch eine post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung beobachtet wurde.

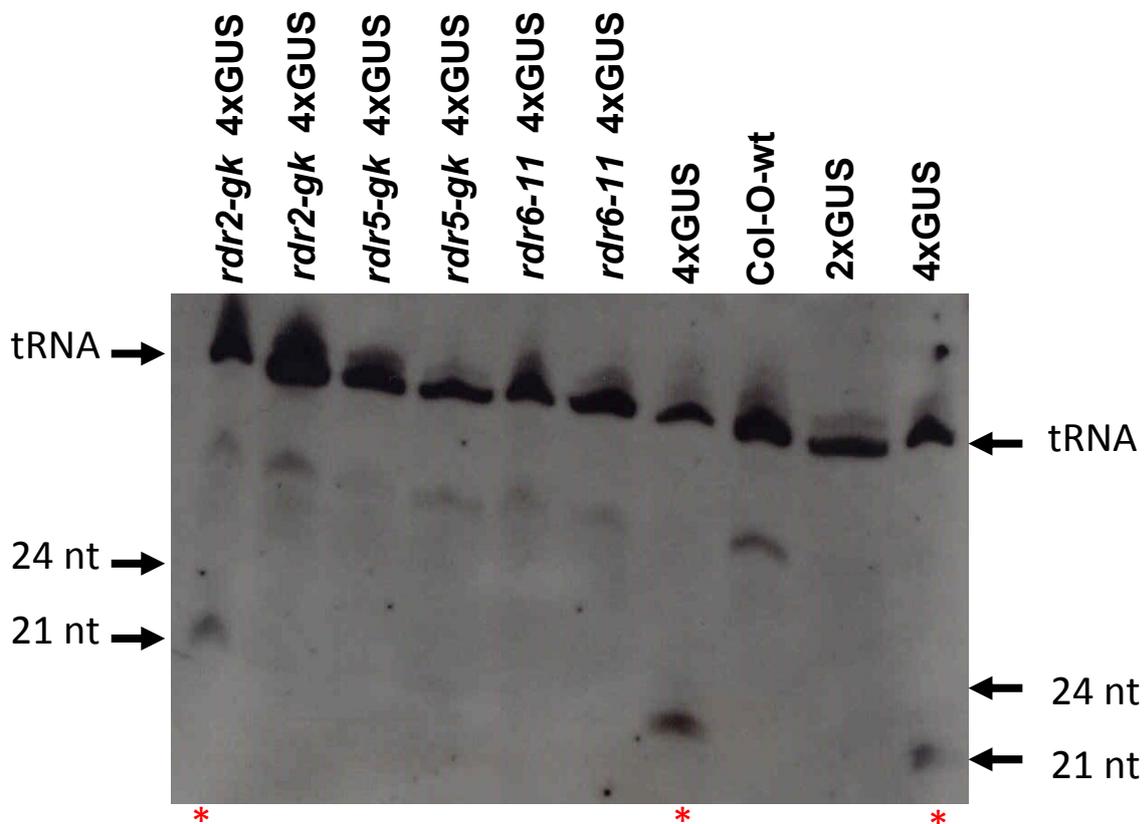


Abbildung C-16: Exemplarischer Nachweis von GUS *antisense* siRNA in 4xGUS und 4xGUS *rdr* Pflanzen. Die Northern Analyse wurde mit siRNA-Präparationen aus 9 Wochen alten 2xGUS, 4xGUS, 4xGUS *rdr2*, 4xGUS *rdr5*, 4xGUS *rdr6* und nicht transgenen Col-0 Pflanzen durchgeführt. Es wurden je 10 µg siRNA pro Spur in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Nylonmembran übertragen und mit der „GUS 3'end“ (592 nt) „sense“ Sonde hybridisiert. Die unteren Signale in den mit Sternen (*) markierten Spuren stellen 21 nt große siRNAs dar.

Southern Analyse unter Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen belegt eine deutliche Verringerung der DNA Methylierung im 3' Bereich des GUS Reportergens in 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen. 4xGUS *rdr5-gk* Pflanzen zeigten im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen ebenfalls verringerte DNA Methylierung, die Reduzierung war aber geringer und weniger gleichförmig als bei 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen. Übereinstimmend zeigten die *rdr6-11* Pflanzen im GUS-Aktivitätstest eine stärkere Beeinträchtigung des PTGS als die *rdr5-gk* Pflanzen. 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen zeigten im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen keine Verringerung der Methylierung (Abb. C-17).

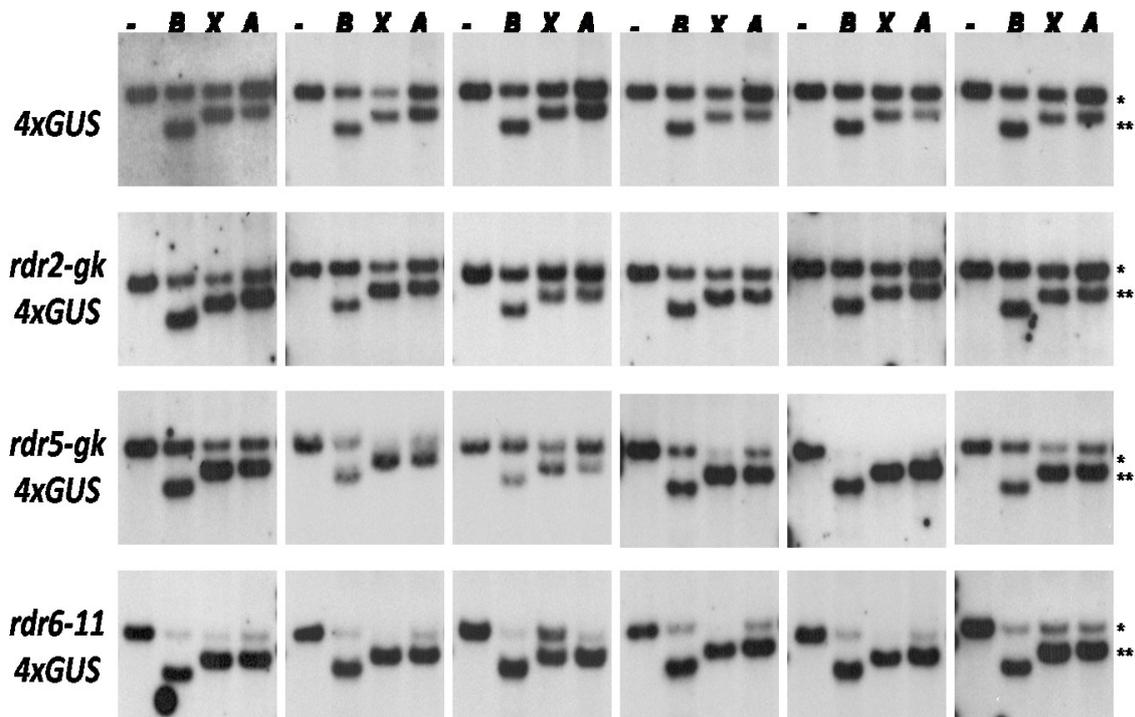


Abbildung C-17: DNA Methylierungsanalyse im 3' Bereich des GUS Reportergens. Genomische DNA aus 9 Wochen alten Pflanzen wurde mit den Cytosin-methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *Bsp68I*, *XbaI* sowie *Alw26I* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GUS "mid" Sonde (481 nt). Auf dem dargestellten Audiogramm wurden die Methylierung indizierenden Fragmente mit * und die fehlende Methylierung indizierenden Fragmente mit ** gekennzeichnet. Eine Karte mit den Positionen der Restriktionsschnittstellen findet sich in Abbildung C-6.

Ausschluss einer möglichen 35S Promoter-spezifischen Interaktion im Fall von 4xGUS *rdr2-gk* und 4xGUS *rdr5-gk*

In der Studie von Daxinger *et al.* (2008) wurden Fälle einer vermutlich transcriptionellen Gen-Inaktivierung von Transgenen mit 35S-Promotoren *in trans* durch komplexe T-DNA Insertionen in GABI-Kat, FLAG oder SALK Linien beobachtet. In Anbetracht dieser Ergebnisse war nicht völlig auszuschließen, dass die Effekte von *rdr2-gk* und *rdr5-gk* über vergleichbare Interaktionen mit dem p35S-GUS Reporter gen in Transgen GUS 2xr 126 erfolgen. Es gibt aber eine Möglichkeit, dies zu testen. Ein Effekt, vom Verlust des funktionellem RDR2 oder RDR5 Genprodukt abhängt, sollte nur im homozygoten Zustand von *rdr2-gk* und *rdr5-gk* sichtbar sein. Die T-DNA Insertionsallele würden sich also wie rezessive Allele verhalten. Ein Effekt über die *in trans* Interaktion von 35S-Promotor-Sequenzen sollte dagegen auch im hemizygoten Zustand von *RDR2/rdr2-gk* und *RDR5/rdr5-gk* sichtbar sein, die T-DNA Insertionsallele erschienen dominant. Die Punktmutation *rdr6-11*, für die die Rezessivität von vorneherein feststand, wurde als Kontrolle verwendet. Entsprechend wurden durch Kreuzung von 4xGUS *rdr2-gk*, 4xGUS *rdr5-gk* und 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen mit 4xGUS Pflanzen für die Mutationen hemi- bzw. heterozygote RDR/*rdr* 4xGUS Pflanzen generiert.

Quantitative GUS-Aktivitätstests zeigten, dass die 4xGUS, 4xGUS *RDR2/rdr2-gk*, 4xGUS *RDR5/rdr5-gk* und die 4xGUS *RDR6/rdr6-11* Pflanzen konsistent deutliches PTGS aufwiesen (Abb. C-18). Die für 9 Wochen alte Pflanzen gemessenen Werte erschienen recht ähnlich. Nach statistischen Kriterien unterschieden sich die Werte der 4xGUS *RDR6/rdr6-11* Pflanzen nicht signifikant ($P < 0,05$) von den Werten der 4xGUS *RDR5/rdr5-gk*. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) konnten allerdings bei den 9 Wochen alten 4xGUS *RDR2/rdr2-gk* Pflanzen zu den 4xGUS *RDR5/rdr5-gk* und 4xGUS *RDR6/rdr6-11* Pflanzen festgestellt werden.

Der histochemischer GUS-Expressionstest zeigte auch bezüglich der räumlichen Verteilung der GUS-Gen-Inaktivierung bzw. der verbleibenden GUS-Expression keinen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen 4xGUS, 4xGUS *RDR6/rdr6-11* sowie den *RDR2/rdr2-gk* bzw. 4xGUS *RDR5/rdr5-gk* Pflanzen (Abb. C-19).

Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse bisher keinen Nachweis für die Annahme, dass die T-DNA Allele *rdr2-gk* und *rdr5-gk* über einen anderen Mechanismus als über den Verlust der *RDR2* bzw. *RDR5* Genfunktion wirken. Eine endgültige Bewertung wird mit den Ergebnissen für die *rdr2-1* und *rdr5-sl* Allele möglich sein.

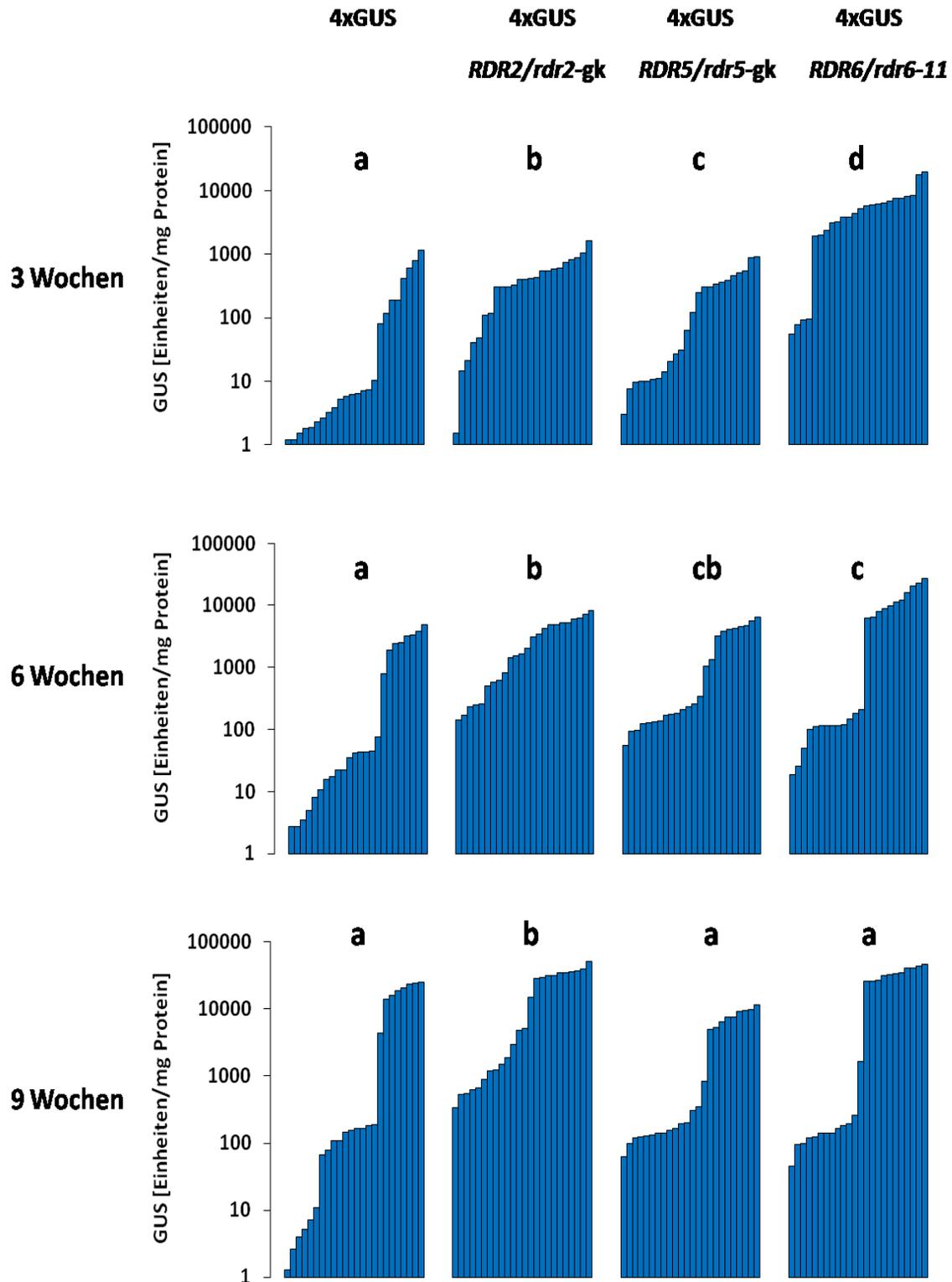


Abbildung C-18: Vergleich der GUS-Aktivität von 4xGUS und 4xGUS *RDR/rdr* Pflanzen. Die Messung erfolgte nach 3, 6 und 9 Wochen, die Mittelwerte der Bestimmungen an jeweils 24 Einzelpflanzen der Linien 4xGUS, 4xGUS *RDR2/rdr-gk*, 4xGUS *RDR5/rdr-gk* und 4xGUS; *RDR6/rdr-11* sind auf einer logarithmischen Skala abgebildet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

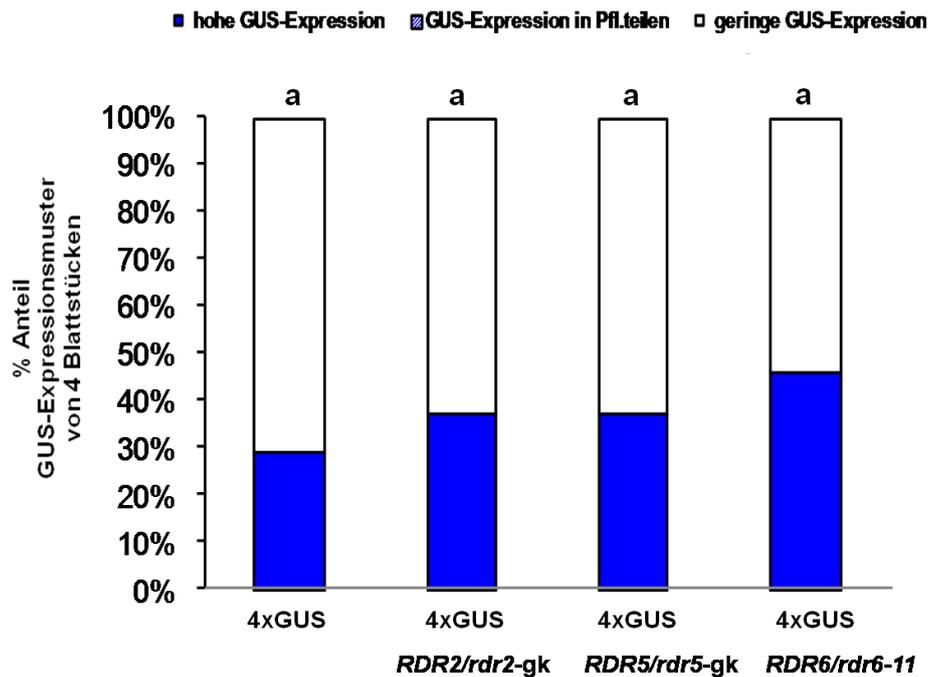


Abbildung C-19: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS und 4xGUS *RDR/rdr* Pflanzen nach 9 Wochen. Der histochemische GUS-Expressionstest erfolgte nach 9 Wochen an je vier Blattstücken pro Pflanze von je 24 4xGUS, 4xGUS *RDR2/rdr2-gk*, 4xGUS *RDR5/rdr5-gk* und 4xGUS *RDR6/rdr6-11* Pflanzen. Deutliche Blaufärbung wurde als Anzeichen hoher GUS-Expression bzw. „GUS positiv“ interpretiert, keine Blaufärbung als Anzeichen für geringe GUS-Expression bzw. „GUS negativ“. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

GUS-Expression in Abhängigkeit der verschiedenen *rdr6* Allele

Der quantitative GUS-Aktivitätstest wies nach 9 Wochen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen den drei verschiedenen *RDR6* Allelen auf (Abb. C-20.). Die 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen zeigten im Vergleich zu den 4xGUS *rdr6-13* und 4xGUS *rdr6-14* Pflanzen eine deutlichere Aufhebung der GUS-Gen-Inaktivierung. Pflanzen der Linie 4xGUS *rdr6-11* wiesen auch im histochemischen GUS-Aktivitätstest eine Inhibierung der GUS-Gen-Inaktivierung auf. Hier zeigten alle Pflanzen (100 %) eine einheitlich hohe GUS-Expression (Abb. C-21).

Die 4xGUS *rdr6-13* Pflanzen wiesen eine starke Streuung innerhalb der gemessenen GUS-Aktivitätswerte auf und zeigten dies auch beim histochemischen GUS-Expressionstest. Sowohl Pflanzen mit einer einheitlich hohen GUS-Expression (34%), als auch Pflanzen die eine einheitlich geringe GUS-Expression (17 %) aufwiesen, wurden beobachtet (Abb. C-21). Pflanzen der Linie 4xGUS *rdr6-14* zeigten zu allen gemessenen Zeitpunkten eine deutliche GUS-Gen-Inaktivierung, was ebenfalls aus histochemischen GUS-Expressionstests nach 9 Wochen abgeleitet werden kann. Hier wurde eine hohe Anzahl von Pflanzen (84 %) beobachtet, die eine einheitlich geringe GUS-Expression (Abb. C-21) aufwiesen.

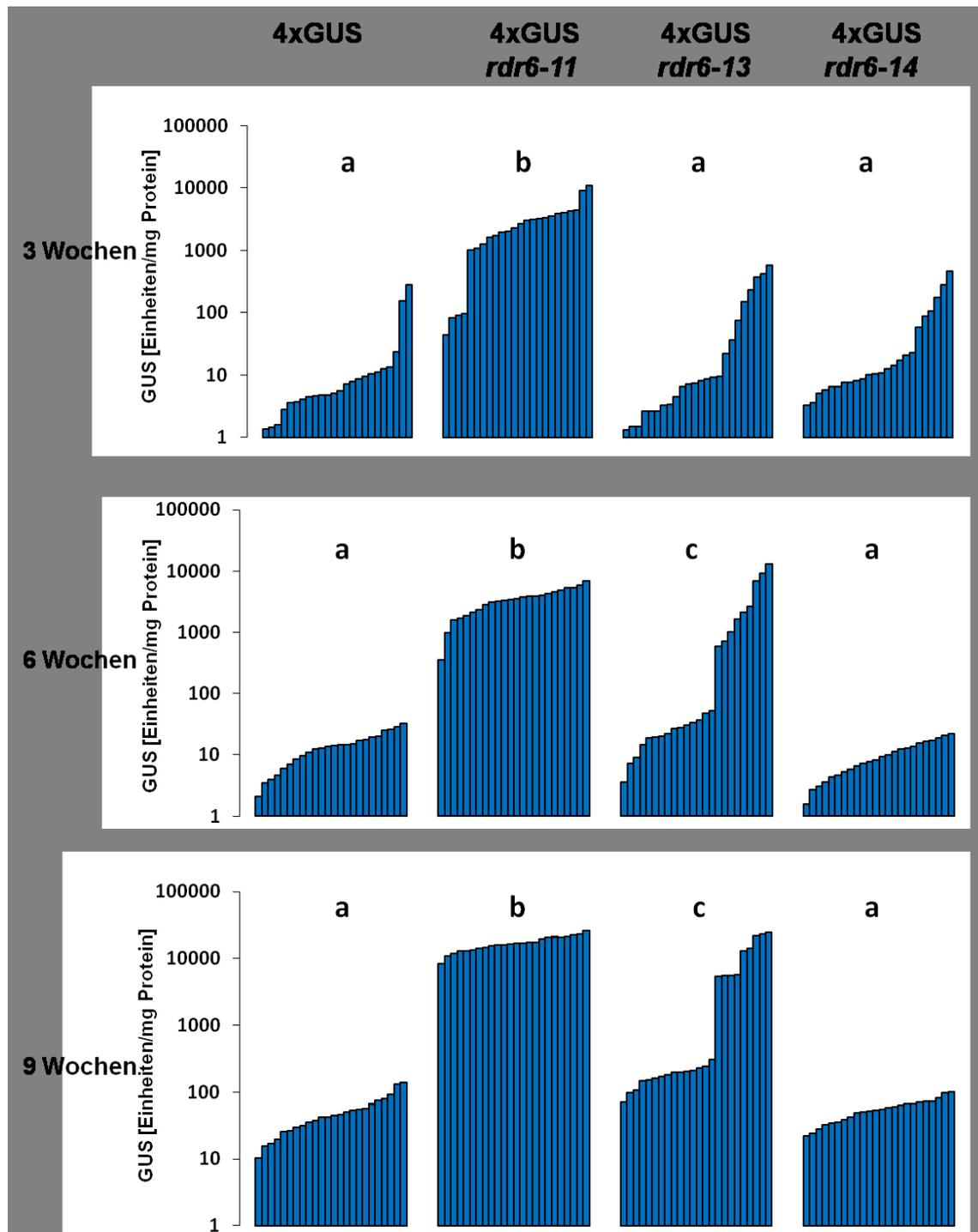


Abbildung C-20: Vergleich der GUS-Aktivität in 4xGUS und 4xGUS *rdr6* Pflanzen mit drei verschiedenen *rdr6* Allelen. Die Messung der GUS-Aktivität erfolgte nach 3, 6 und 9 Wochen an je 24 Einzelpflanzen der Linien 4xGUS, 4xGUS *rdr6-11*, 4xGUS *rdr6-13* und 4xGUS *rdr6-14*. Die Messwerte werden auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

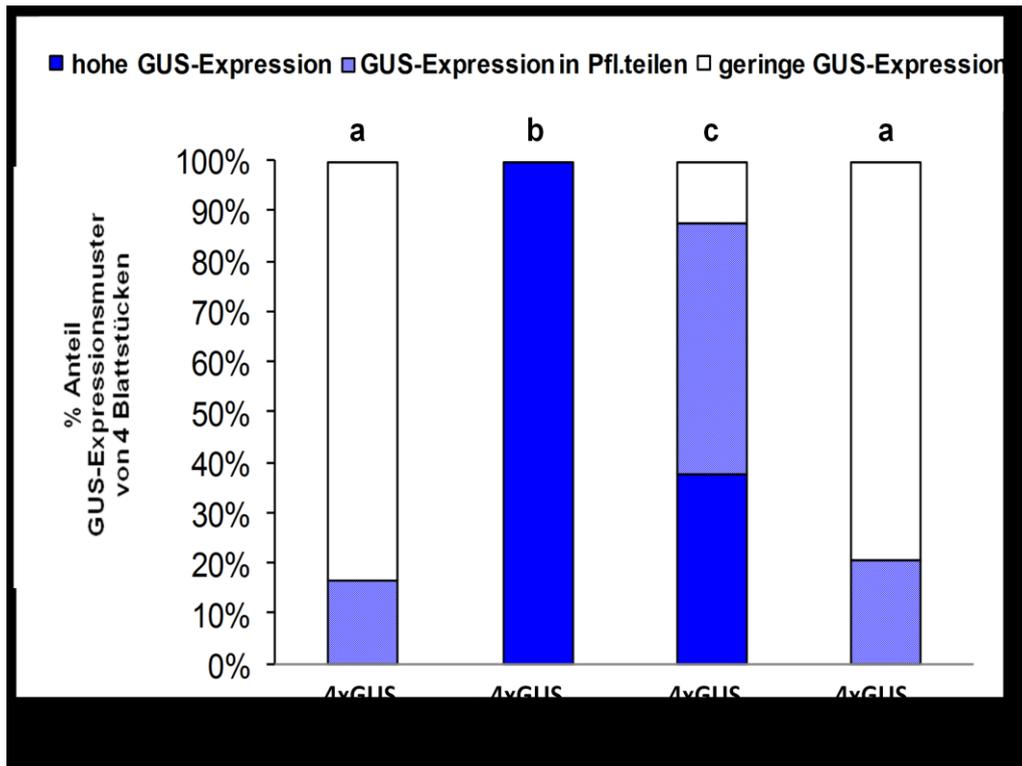


Abbildung C-21: Histochemischer GUS-Expressionstest an 4xGUS und 4xGUS *rdr6* Pflanzen mit drei verschiedenen *rdr6* Allelen nach 9 Wochen. Der histochemische GUS-Expressionstest erfolgte nach 9 Wochen an je vier Blattstücken einer Pflanze an 24 4xGUS, 4xGUS *rdr6-11*, 4xGUS *rdr6-13* und 4xGUS *rdr6-14* Pflanzen. Deutliche Blaufärbung wurde als Anzeichen hoher GUS-Expression bzw. „GUS positiv“ interpretiert, keine Blaufärbung als Anzeichen für geringe GUS-Expression bzw. „GUS negativ“. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

C.2. Korrelation zwischen Kopienzahl und Expression eines Reportergens im Endosperm von Gerste

An homozygot transgenen Gerstenpflanzen wurde untersucht, inwieweit die Expression eines rekombinanten Modellproteins wie *GFP* im Endosperm mit der Gendosis korreliert. Dabei war insbesondere von Interesse, ob und wenn ja, ab welcher T-DNA Kopienzahl, eine post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung der Reportergenexpression einsetzt.

C.2.1. Erzeugung transgener Linien mit unterschiedlichen Kopienzahlen eines *GFP* Reportergens

Transgene Gerste wurde durch Agrobakterien-vermittelte Transformation embryogener Pollenkulturen (Kumlehn *et al.* 2006) aus zweizeiliger Wintergerste (*Hordeum vulgare* L.) des Kultivars Igri (Saatzucht Ackermann, Irlbach) erzeugt.

Die Herstellung von homozygot transgenen Linien erfolgte unter Verwendung von T-DNA Konstrukt pSB262 (Abb. C-22). Diese T-DNA enthält ein für ein Grün-Fluoreszierendes Protein in der Version sGFP (S65T)-KDEL nach Chiu *et al.* 1996 kodierendes Reportergen. Die GFP-Variante sGFP (S65T) hat ein gegenüber nativem GFP in den längerwelligen Lichtbereich verschobenes Anregungsmaximum. Fotochemische Schäden des zu untersuchenden Pflanzenmaterials werden so vermindert bzw. vermieden und die störende Autofluoreszenz des Pflanzenmaterials wird im Vergleich zur Anregung mit kurzwelligem UV-Licht minimiert. Das *GFP*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des Endosperm-spezifischen Promoters des α -Gliadin (α G)-Gens aus Weizen (Vickers *et al.* 2006).

Die Expression des *GFP*-Gens kann in Pflanzen durch Quantifizierung der Fluoreszenz sehr gut erfasst werden.



Abbildung C-22: T-DNA Konstrukt zur Transformation von *H. vulgare* (cv. Igri). Die T-DNA wird von LB - linke Randsequenz der T-DNA („left border“) und RB - rechte Randsequenz der T-DNA („right border“) flankiert. Das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (*HPT*) befindet sich unter Kontrolle des Ubiquitin Promoters (Ubi-int pro) aus Mais und wird vom CaMV 35S (35St) Polyadenylierungssignal terminiert. Es dient als Selektionsmarker bei der Transformation. Als Reporter dient ein Gen für Grün-Fluoreszierendes Protein (sGFP, synthetisches GFP (S65T)-KDEL), das sich unter der Kontrolle des Endosperm-spezifischen Promoters des α -gliadin (α -G'pro) Gens aus Weizen befindet und vom Polyadenylierungssignal des Nopalin-Synthase-Gens (NOST) aus *Agrobacterium tumefaciens* terminiert wird.

Die Transformation embryogener Pollenkulturen und anschließende Regeneration doppelhaploider Gerstenpflanzen erfolgte nach Kumlehn *et al.* (2006) (Abb. C-23). Unter den aus der Transformation erhaltenen, Hygromycin-resistenten Pflänzchen wurden mittels Durchflusszytometrie an isolierten Zellkerne 75 haploide Individuen (Bezeichnung BA 1 bis BA 75) identifiziert. Diese wurden mittels PCR auf die Präsenz des Reportergens *GFP* untersucht.

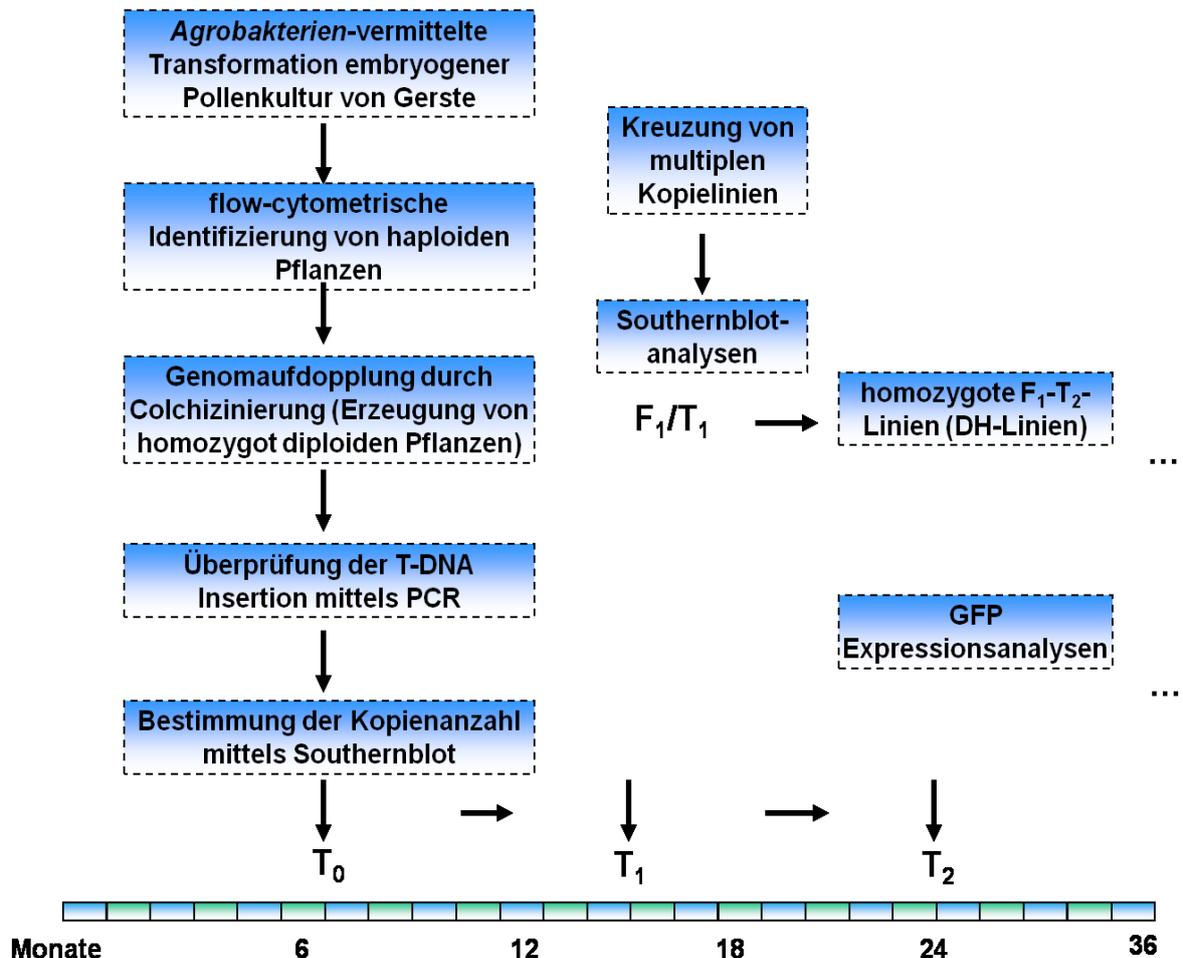


Abbildung C-23: Agrobakterien-vermittelte Transformation embryogener Pollenkulturen von Gerste. Exemplarischer Zeitplan der Herstellung homozygot transgener Gerste. Die Arbeitsschritte umfassten die Transformation, die Identifizierung von haploiden Pflanzen (Durchflusszytometrie) und anschließend die Colchizin-Behandlung zur Genomaufdopplung (doppelhaploide Pflanzen). Zur Bestimmung von T-DNA Integrität und Kopienzahl wurden PCR- und Southern-Analysen durchgeführt. Nach erfolgter Identifizierung von homozygoten Linien mit multiplen T-DNA-Kopien wurden die GFP-Expression in Samen der T₂-Generation untersucht sowie Kreuzungen zur Erzeugung von Linien mit höherer Kopienzahl durchgeführt.

Die Anwesenheit der GFP Expressionskassette konnte nur bei 35 der 75 identifizierten haploiden Regenerate durch PCR nachgewiesen werden. Diese 35 bestätigten haploiden transgenen Gerstenpflanzen wurde zur Verdopplung des Chromosomensatzes mit Colchizin behandelt. Es entstanden homozygot diploide (doppelhaploide, DH) transgene Linien, die für alle Genorte einschließlich der T-DNA-Insertionen homozygot waren. Zusätzlich standen in der Arbeitsgruppe PRB aus früheren Transformationen mit T-DNA Konstrukt pSB262 bereits acht unabhängige doppelhaploide transgene T₁-Gerstenlinien (Bezeichnung PS) zur Verfügung.

Die acht (PS) bzw. 35 (BA) transgenen doppelhaploiden Linien wurden durch Southern-Hybridisierung auf die Zahl an integrierten T-DNA Kopien untersucht. In Abb. C-24 ist exemplarisch eine Southern-Analyse von homozygot transgenen PS-T₁-Pflanzen und BA-T₀-Pflanzen gezeigt. Die DNA wurde mit einem Restriktionsenzym gespalten, das in der Sequenz der T-DNA nur einmal vorkommt. Entsprechend entstehen für jede integrierte T-DNA zwei DNA Fragmente (LB- und RB-Fragment), deren Länge jeweils durch die Lage der nächsten Restriktionsschnittstellen in der flankierenden genomischen DNA bestimmt wird. Hybridisierung mit den verwendeten Sonden macht jeweils eines der beiden Fragmente sichtbar. Die Zahl der für eine Pflanze sichtbaren Hybridisierungssignale ergibt somit die (Mindest-) Zahl an integrierten T-DNA Kopien.

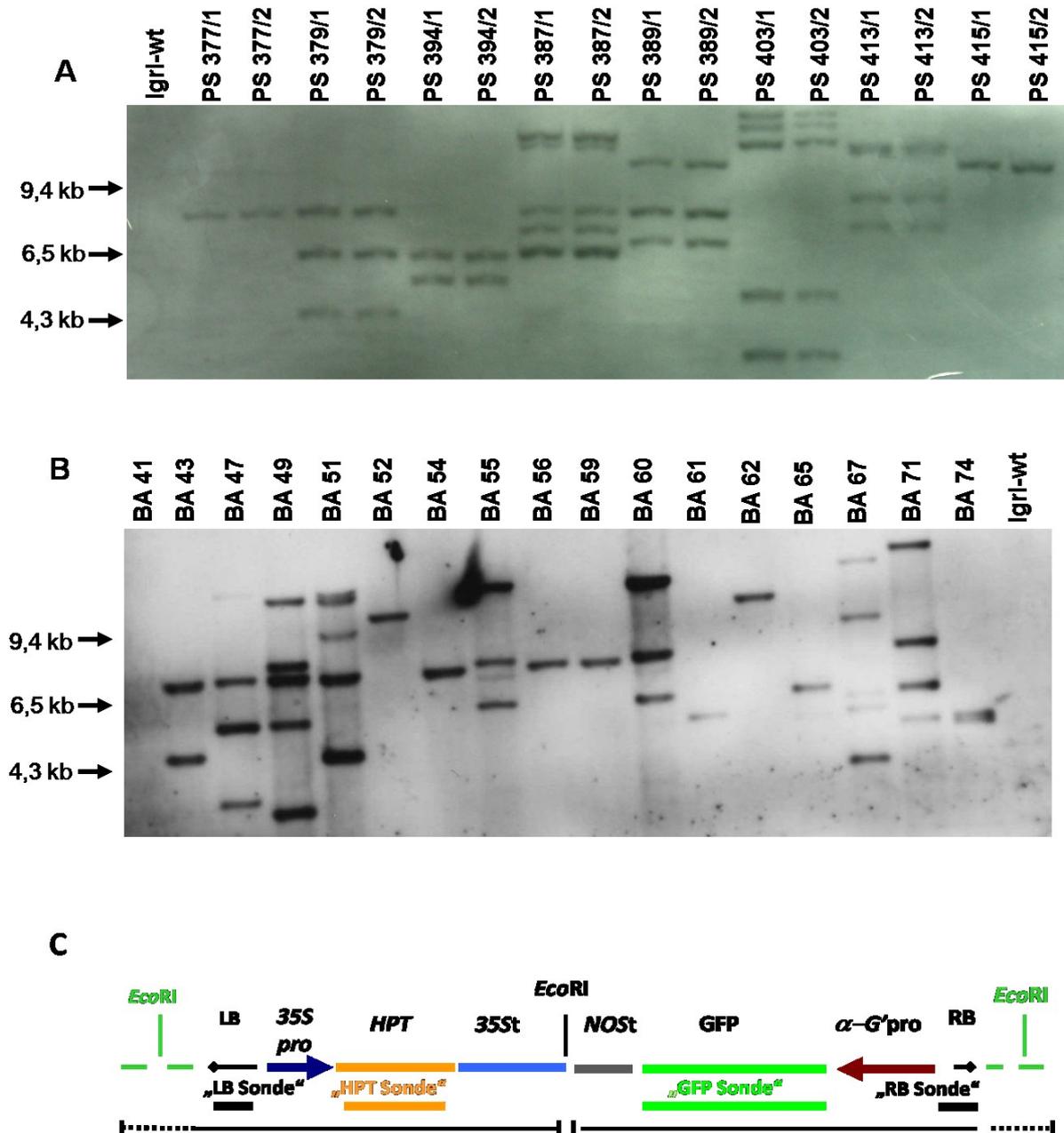


Abbildung C-24: Southern-Hybridisierung zur Bestimmung der T-DNA Kopienzahl in PS und BA-Pflanzen. A und B Genomische DNA von jeweils zwei Nachkommen der acht PS-T₁-Linien, 17 der 35 BA-T₀-Pflanzen sowie von nicht-transgenen Pflanzen der Sorte Igrl (wt) wurde mit *EcoRI* gespalten und auf einem 0,8% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *GFP*-spezifischen DNA-Sonde („GFP-Sonde“). **C** Schematische Darstellung der T-DNA des Konstruktes pSB262 und der Positionen der vier Sonden, die für die Southern-Hybridisierung verwendet wurden: „left border“ Sonde („LB Sonde“), Hygromycin-Phosphotransferase-Sonde („HPT Sonde“), GFP Protein Sonde („GFP Sonde“) und „right border“ Sonde („RB Sonde“).

Durch Hybridisierung mit der GFP-Sonde konnten unter den acht unabhängigen, homozygot transgenen PS-Linien zwei PS-Linien mit einer (PS 377 und 415), eine Linie mit zwei (PS 394), drei Linien mit drei (PS 379, 389 und 413), eine Linie mit vier (PS 387) und eine Linie (PS 403) mit fünf T-DNA Kopien identifiziert werden (Abb. 24-A und Tab. C-2). Von den mit der GFP-Sonde untersuchten BA-T₀-Linien wiesen hingegen 14 Linien (40 %) eine, sechs Linien (17 %) zwei, acht Linien drei (23 %), drei Linien (9 %) vier und eine Linie (3 %) fünf Transgenkopien auf (Abb. 24-B und Tab. C-2). T₂ Pflanzen der acht PS-Linien sowie T₁ Pflanzen von sieben ausgewählten BA-Linien wurden durch Hybridisierung mit weiteren Sonden zusätzlich charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Auswertung aller Southern-Analysen mit diesen Linien sind in Tab. C-2 zusammengefasst.

Tabelle C-2: T-DNA Kopienzahl in homozygot transgenen PS/BA-T_{1/2}-Pflanzen nach Southern Analyse.

PS/BA-T _{1/2} -Linien	Anzahl der T-DNA Kopien	Anzahl Southern-Hybridisierungssignale			
		LB-Sonde	HPT Sonde	GFP Sonde	RB Sonde
PS 377	1	1	1	1	1
PS 415	1	1	1	1	1
BA 26	1	1	1	1	1
PS 394	2	2	2	2	2
BA 43	2	2	2	2	2
PS 379	3	3	3	3	3
PS 389	3	3	3	3	3
PS 413	3	3	3	3	3
PS 387	4	4	4	4	4
BA 47	4	4	4	4	4
BA 51	4	4	4	4	4
BA 67	4	4	4	4	4
BA 71	4	4	4	4	4
PS 403	5	5	5	5	5
BA 49	5	5	5	5	5

Zur Überprüfung des homozygoten Status der verwendeten transgenen Gerstenpflanzen wurden aus den acht PS- und den sieben BA-Linien jeweils bis zu 20 durch Selbstung erhaltene T₂-Pflanzen mittels Southern-Hybridisierung untersucht. Falls T-DNA Kopien in nicht-homozygotem Status vorgelegen wären, wäre für sie eine Segregation in der Nachkommenschaft zu erwarten gewesen. In Abb. C-25 sind exemplarisch die Hybridisierungsmuster von 19 T₂-Nachkommen der homozygot transgenen Linie BA 49 dargestellt. Alle 19 Nachkommen weisen ein identisches Muster von fünf spezifischen

Hybridisierungssignalen auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten für alle anderen untersuchten PS- und BA-Linien mit allen vier verwendeten Sonden erzielt werden. Die Southern-Ergebnisse belegen den homozygoten Status aller T-DNA Insertionen in den untersuchten transgenen PS und BA-Linien.

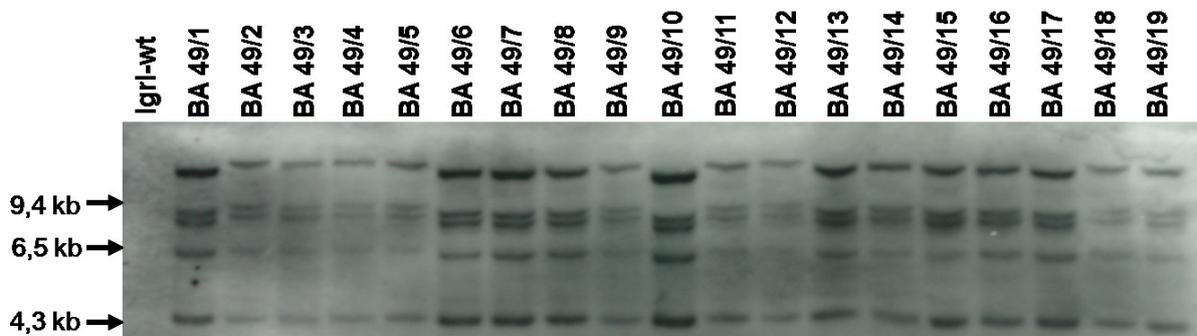


Abbildung C-25: Southern-Analyse von T₂-Pflanzen der Linie BA 49. Genomische DNA aus 19 BA 49 T₂-Pflanzen sowie einer nicht transgenen Pflanze des Kultivars Igri wurden mit *EcoRI* gespalten und auf einem 0,8 % (v/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Hybridisierung mit *GFP*-Sonde. Banden mit gleicher Laufweite repräsentieren jeweils eine T-DNA-Kopie. Das Ausbleiben einer Segregation von Hybridisierungssignalen legt den homozygoten Status aller T-DNA Kopien in der Mutterpflanze nahe.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von homozygot transgenen Gerstenlinien

In der Arbeitsgruppe Karyotypevolution der IPK wurden von Dr. Koichi Watanabe Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) an Metaphase-Chromosomen von einer Auswahl an homozygot transgenen BA Linien durchgeführt. Metaphase-Chromosomen wurden aus Wurzelspitzen von Gerstenkeimlingen präpariert und mit markiertem Binärvektor pSB262 DNA (Abb. C-22), 45S rDNA, 5S rDNA und (ACT)₆ Mikrosatellit-DNA als Sonden hybridisiert. Individuelle Arme der Gerstenchromosomen wurden anhand der Hybridisierungssignale von 45S rDNA, 5SrDNA und (ACT)₆ Mikrosatellit-DNA identifiziert (Cuadrado und Jouve 2007, Fukui *et al.* 1994). Abb. C-26 stellt beispielhaft den Nachweis eines Transgen-Locus (zwei Doppelsignale) auf dem kurzen Arm von Chromosom 5H in der homozygot transgenen Linie BA 51 dar. Tabelle C-3 fasst die Ergebnisse der FISH Analyse zusammen und vergleicht sie mit den Ergebnissen der Southern Analyse in Tabelle C-2. Bei der Southern-Hybridisierung wurden für Linie BA 51 vier spezifische Hybridisierungssignale detektiert. Daher ist anzunehmen, dass sich in Linie BA 51 vier T-DNA Kopien in einem gemeinsamen Gen-Locus auf Chromosoms 5H befinden, die bei der FISH Analyse als ein Signal erscheinen.

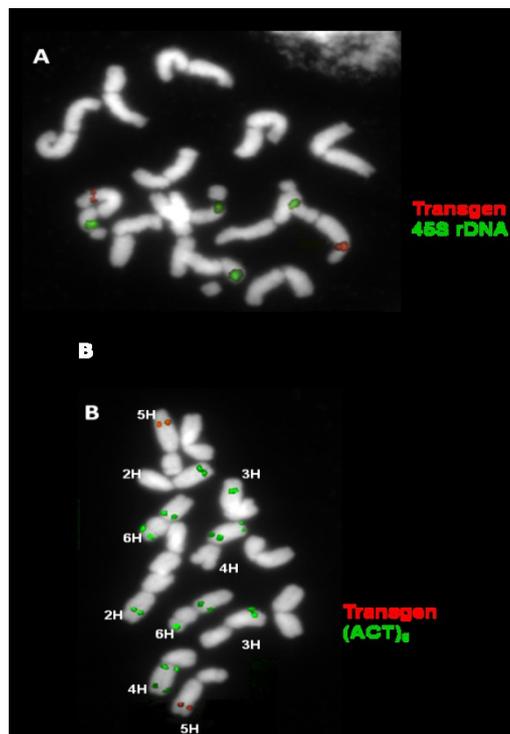


Abbildung C-26: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der Linie BA 51. Das FISH-Protokoll (unveröffentlicht) wurde von Dr. Koichi Watanabe in Anlehnung an Kato *et al.* (2006) erstellt. **A** Hybridisierung mit den Sonden „Transgen“ (rote Signale) und 45S rDNA (grüne Signale) und **B** Hybridisierung mit den Sonden „Transgen“ (rote Signale) und (ACT)₆ (grüne Signale) an Metaphase-Chromosomen (2n=14) der homozygot transgenen Linie BA 51.

Tabelle C-3: Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von homozygot transgenen BA-Gerstenlinien. p = kurzer Arm und q = langer Arm der Chromosomen

Linie	Southern-Signale (Anzahl)	FISH-Signale (Anzahl, Lokalisation)
BA 26	1	2 Chromosom 7H; Chromosom 5H (q)
BA 43	2	1 Chromosom 7H
BA 47	4	2 Chromosom 4H (p); Chromosom 4H (p)
BA 51	4	1 Chromosom 5H (q)
BA 67	4	1 Chromosom 7H (q)
BA 71	4	3 Chromosom 7H (p); Chromosom 1H; Chromosom 3H (q)
BA 49	5	1 Chromosom 4H (q)

Kreuzung von homozygot transgenen Gerstenlinien mit multiplen Kopien des Reportergens *GFP*

Anhand molekulargenetischer Untersuchungen konnte von Lechtenberg *et al.* (2003) und Schubert *et al.* (2004) in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass die Expression von Transgenen durch post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung negativ reguliert wird, wenn die Menge an Transkript (z. B. *GUS* oder *GFP*) einen genspezifischen Schwellenwert übersteigt.

In doppelhaploiden Gersten-Transformanten wurden maximal fünf integrierte T-DNA Kopien beobachtet. Durch Kreuzungen zwischen den homozygot transgenen Linien, die im Abschnitt C.2.1 beschrieben wurden, und anschließender Herstellung von doppelhaploiden F_2 Nachkommen sollten weitere Linien mit einer möglichst breiten Palette von T-DNA-Kopienanzahlen hergestellt werden. PS- T_2 -Pflanzen mit zwei, drei, vier und fünf Hybridisierungssignalen bzw. BA- T_2 -Pflanzen mit vier und fünf Hybridisierungssignalen wurden untereinander gekreuzt.

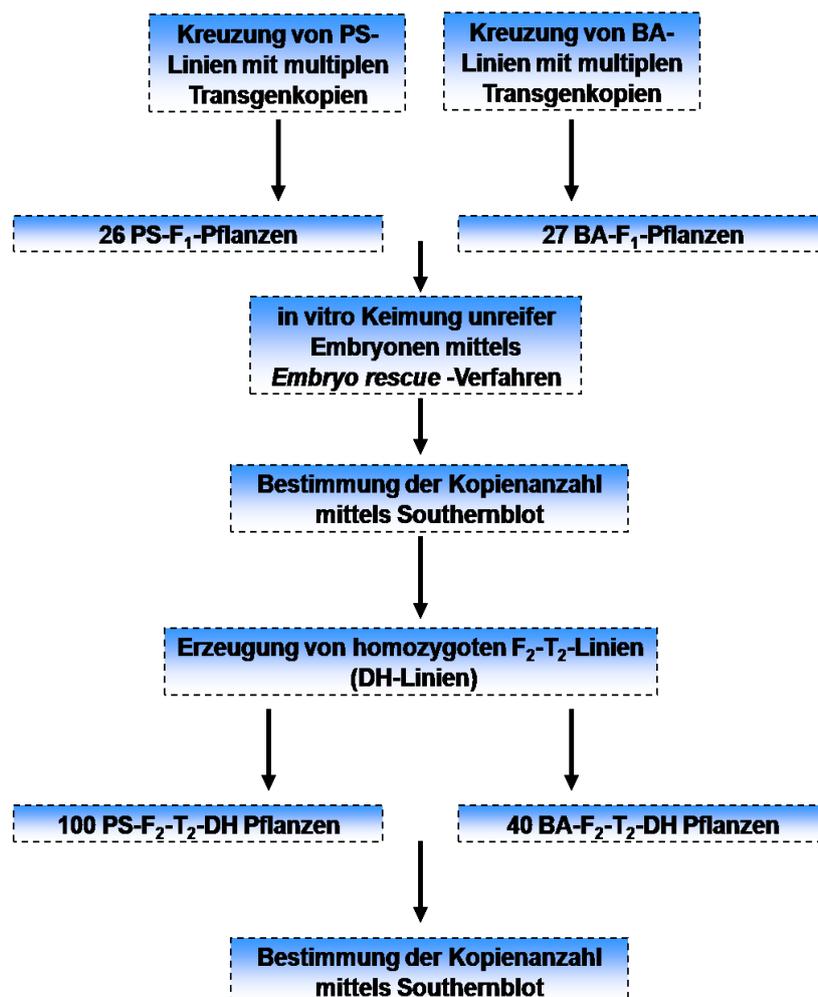


Abbildung C-27: Strategie zur Herstellung von homozygot transgenen PS- bzw. BA-Linien mit einer breiten Palette von T-DNA Kopienzahlen.

Aus den Kreuzungskombinationen der PS-T₁-Linien und BA-T₁-Linien wurden 26 bzw. 27 F₁-Pflanzengruppen erhalten. In der Abb. C-28 im Teilbild A ist exemplarisch die Southern-Analyse hemizygoter F₁-Nachkommen aus der Kreuzung der homozygot transgenen PS-T₁-Linie 403 (mit fünf spezifischen Hybridisierungssignalen) mit der PS-T₁-Linie 387 (mit vier spezifischen Hybridisierungssignalen) dargestellt. Es konnten in den F₁-Nachkommen konsistent acht spezifische Hybridisierungssignale nachgewiesen werden.

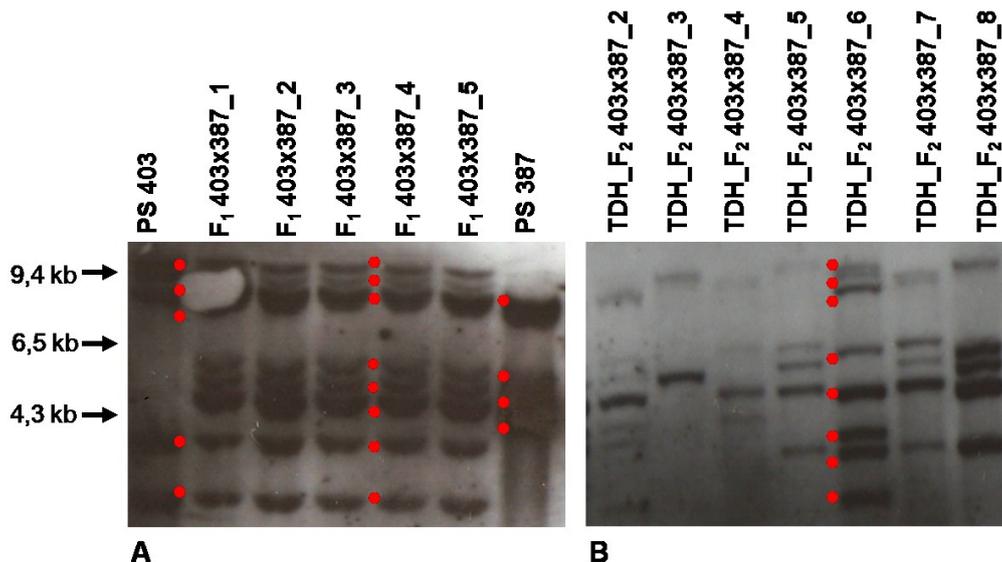


Abbildung C-28: Southern-Analyse hemizygoter F₁- und doppelhaploider F₂ Pflanzen aus der Kreuzung (PS 403 x PS 387). **A** Genomische DNA von hemizygoten F₁-Pflanzen sowie Pflanzen der T₁-Elternlinien PS 403 und PS 387 wurde mit *EcoRI* geschnitten und auf einem 0,8% (v/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit *GFP* Sonde. **B** Genomische DNA von doppelhaploiden F₂ Pflanzen wurde mit *EcoRI* geschnitten und auf einem 0,8% (v/v) Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit *GFP* Sonde. Die roten Punkte markieren die spezifischen Hybridisierungssignale.

Aus unreifem Pollen solcher hemizygoten F₁-Pflanzen wurden doppelhaploide F₂ Pflanzen regeneriert. Insgesamt wurden aus der Kreuzung von PS-Linien 100 und aus der Kreuzung von BA-Linien 40 doppelhaploide transgene Linien der F₂ Generation abgeleitet (B.2.5). Die Bestimmung der Zahl der vorhandenen T-DNA Kopien erfolgte erneut durch Southern-Analyse. In Abb. C-28, Teilbild B sind exemplarisch die Hybridisierungsmuster von doppelhaploiden transgenen F₂-Linien aus der Kreuzung PS 403 mit PS 387 dargestellt. Es konnten homozygote Linien mit sechs, sieben und acht T-DNA Kopien identifiziert werden.

C.2.2. GFP Expression im Endosperm in Abhängigkeit von der T-DNA Kopienzahl

Um zu klären, bis zu welcher maximalen Anzahl von T-DNA-Kopien des verwendeten Konstrukts in Gerste noch keine post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung im Endosperm zu beobachten ist, bzw., wie stark die Transgenexpression in Abhängigkeit der Kopienzahl im Endosperm reduziert ist, wurde die *GFP* Expression in Linien mit unterschiedlicher T-DNA Kopienzahl verglichen untersucht. Es wurden ausschließlich Körner verwendet, die durch Selbstung von homozygot transgenen Pflanzen erhalten wurden, um Komplikationen durch die Segregation von Transgenloci zu vermeiden.

Mikroskopische Bonitur der *GFP*-Fluoreszenz in unreifen und reifen Gerstenkaryopsen

Unreife Ähren bzw. deren Karyopsen sowie reife Ähren homozygot transgener PS/BA-T₂-Pflanzen wurden geerntet und mittels Fluoreszenz-Stereomikroskopie auf GFP-vermittelte Fluoreszenz im Endosperm untersucht.

Körner mit starker GFP-Fluoreszenz wurden dabei mit „GFP++“, Körner mit mittlerer GFP-Fluoreszenz mit „GFP+“ und Körner ohne nachweisbare GFP-Fluoreszenz mit „GFP-“ attribuiert (Abb. C-29 und Abb. C-30).

GFP-Fluoreszenz konnte in den Körnern unreifer Ähren („Teigreife“) aller untersuchten PS/BA-Linien unabhängig von der T-DNA Kopienzahl nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Intensität der GFP-Fluoreszenz wurden jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den Linien mit den verschiedenen T-DNA Kopienanzahlen gefunden. Mittlere GFP-Fluoreszenz wurde in Linien mit einer, zwei und drei T-DNA Kopien (PS 415; PS 377, PS 394; PS 389) beobachtet. Bei Linien mit drei, vier und fünf T-DNA Kopien (PS 379; PS 387, BA 51 und PS 403) wiesen die unreifen Körner eine starke GFP-Fluoreszenz auf (Abb. C-31).

Die unreifen Körner von PS-Linie 379 mit nach der Southern Analyse drei T-DNA Kopien wiesen die stärkste GFP-Fluoreszenz auf und übertrafen die Körner aller anderen Linien, inklusive der mit mehr T-DNA Kopien (Abb. C-29 im Teilbild C). In allen untersuchten PS/BA-Linien war die GFP-Fluoreszenz gleichmäßig über die unreifen Körner in den Ähren verteilt.

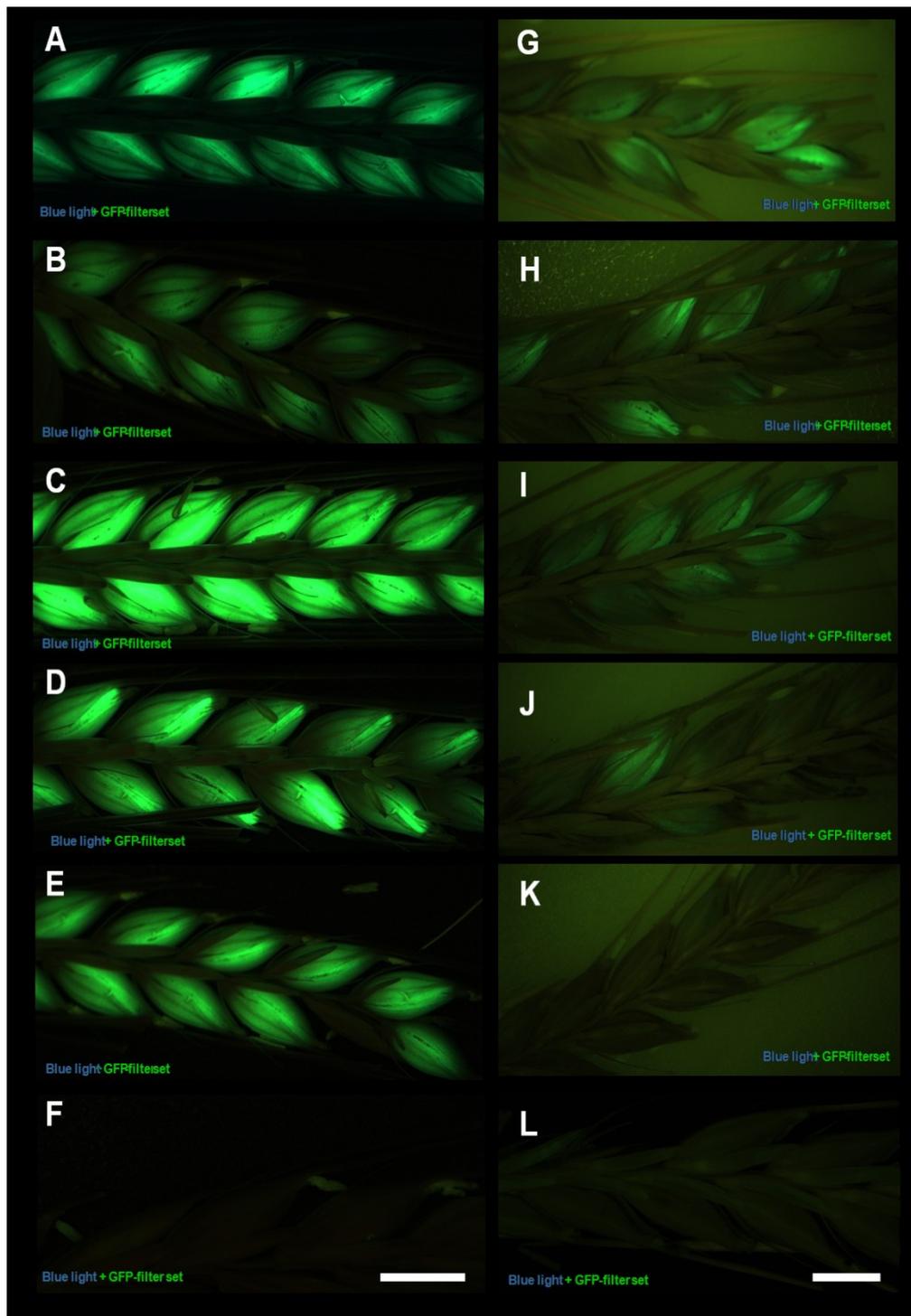


Abbildung C-29: GFP-Fluoreszenz in Ähren von PS- und BA Linien im Stadium der Teigreife und Vollreife. Untersucht wurden Ähren von PS Linien im Stadium der Teigreife (**A** bis **F**) und von BA Linien im Stadium der Vollreife (**G** bis **L**): **A** Linie PS 377 (1 T-DNA Signal), **B** Linie PS 394 (2 T-DNA Signale), **C** Linie PS 379 (3 T-DNA Signale), **D** Linie PS 387 (4 T-DNA Signale), **E** Linie PS 403 (5 T-DNA Signale) und **F** nicht transgene Gerste cv. Igri. **G** Linie BA 26 (1 T-DNA Signal), **H** Linie BA 43 (2 T-DNA Signale), **I** Linie BA 43 (4 T-DNA Signale), **J** Linie BA 51 (4 T-DNA Signale), **K** Linie BA 49 (5 T-DNA Signale) und **L** nicht transgene Gerste cv. Igri. Skalenbalken entspricht 1 cm. Ähren im Stadium der Vollreife (**G** bis **L**) wurden vor der Untersuchung für 24 Stunden bei 4°C gelagert.

Ein anderes Bild ergab sich aus der Analyse der reifen Ähren der BA-Linien mit unterschiedlicher T-DNA Kopienanzahl (Abb. C-29 im Teilbild G bis K). Die Bonitur der GFP-Fluoreszenz zeigte deutlich, dass nicht in allen Körnern der Ähren GFP-Fluoreszenz nachzuweisen war. Es wurden keine Ähren beobachtet, in denen alle Körnern starke GFP-Fluoreszenz zeigten. Für Linie BA 49 mit fünf T-DNA Signalen konnte in keinem der Körner GFP-Fluoreszenz detektiert werden.

Bei der Untersuchung einzelner reifer Körner zeigten Linien mit einer, zwei, drei, vier und fünf T-DNA Kopien (PS 415; PS 377, PS 394; PS 389, BA 71 und BA 49) mittlere („GFP+“) und keine nachweisbare GFP-Fluoreszenz („GFP-“). Körner anderer Linien mit drei, vier und fünf T-DNA Kopien (PS 379; PS 387, BA 51, BA 67 und PS 403) wiesen starke, mittlere und keine nachweisbare GFP-Fluoreszenz auf (Abb. C-30).

Zur besseren Begutachtung der unterschiedlichen Intensitäten der GFP-Fluoreszenz wurden reife Körner längs halbiert (Abb. C-30, Teilbilder C und F).

Anhand dieser Längsschnitte wurde die Abstufung der GFP-Fluoreszenz im Endosperm besser sichtbar. In Abb. C-30 sind exemplarisch die Abstufungen der GFP-Fluoreszenz („GFP++“, „GFP+“ und „GFP-“) für die reifen Körner der Linie PS 379 (drei T-DNA Kopien) und PS 387 (vier T-DNA Kopien) dargestellt. Eine Zusammenfassung der GFP-Bonitur für alle untersuchten Linien findet sich in Abb. C-31.

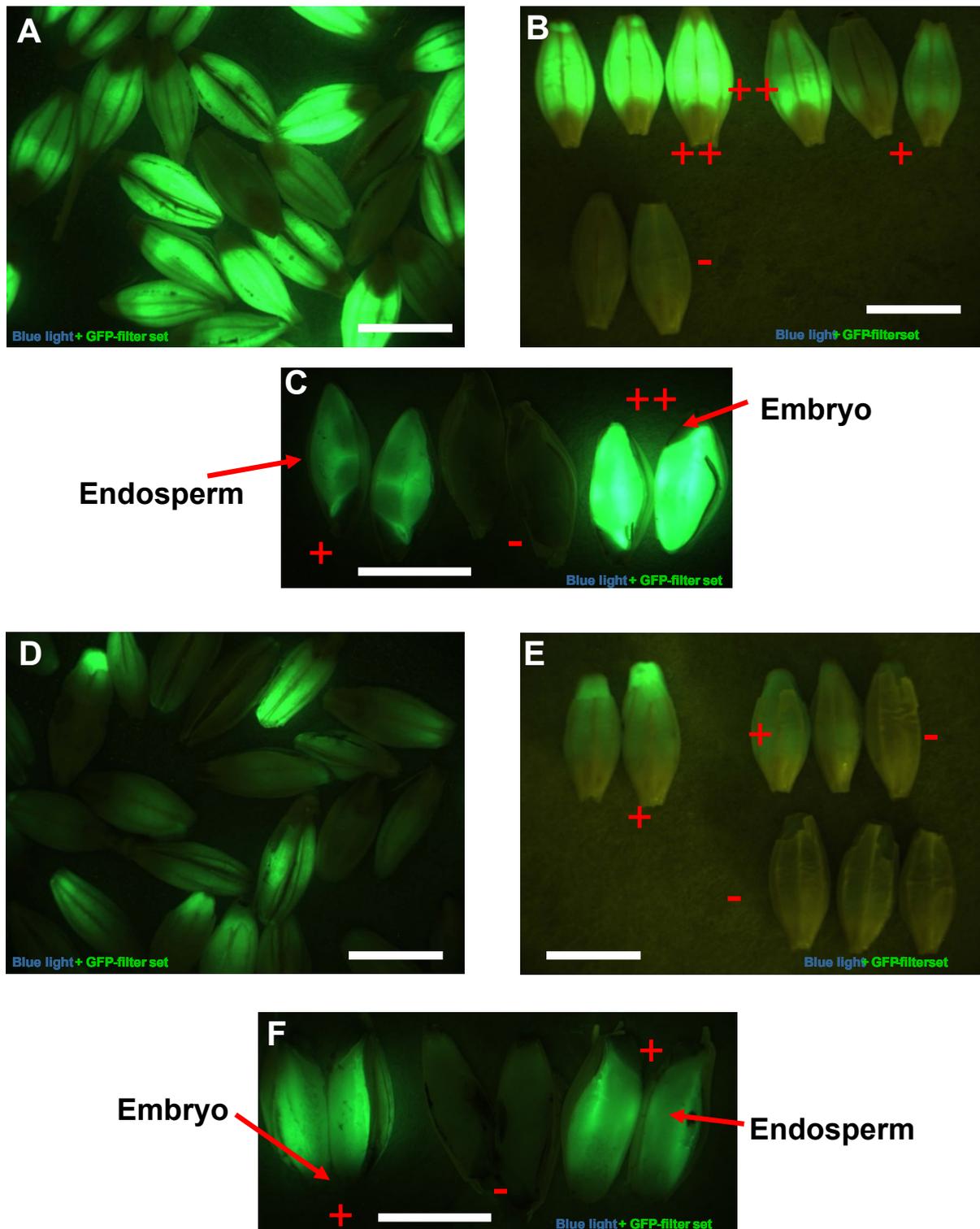


Abbildung C-30: GFP-Fluoreszenz in Gerstenkaryopsen der PS-Linien im Stadium der Vollreife. A Körner im reifen Stadium der Linie PS 379 (drei T-DNA Kopien). Teilbild C zeigt halbierte Körner der Linie PS 379 in den Kategorien ++ „starke“, + „mittlere“ und - „keine“ GFP-Fluoreszenz B Körner im Stadium der Notreife der Linie PS 387 (vier T-DNA Kopien). Teilbild F zeigt halbierte Körner der Linie PS 387 in den Kategorien + „mittlere“ und - „keine“ GFP-Fluoreszenz.

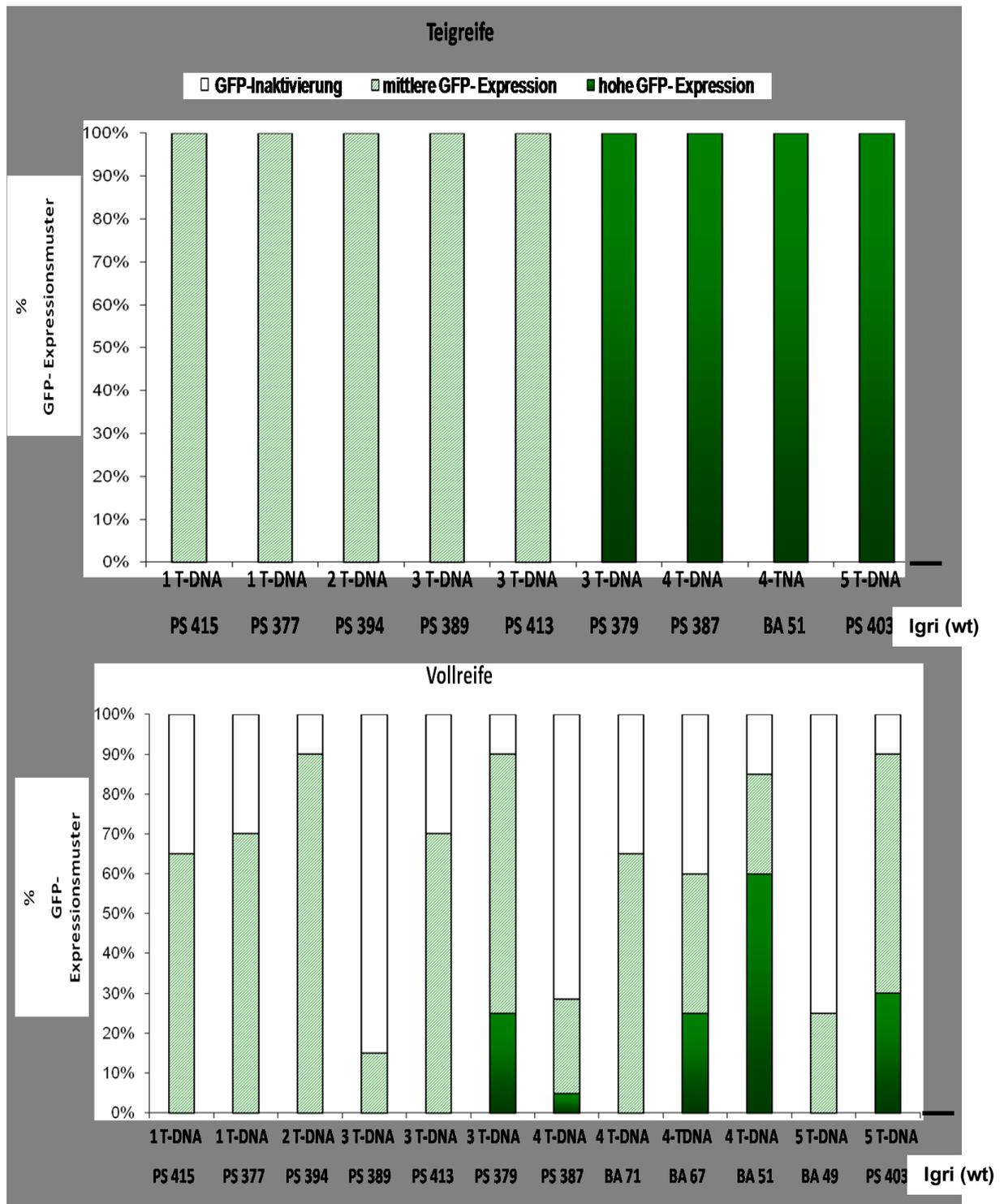


Abbildung C-31: GFP-Fluoreszenz in unreifen und reifen Körnern von homozygoten transgenen PS/BA T₂ Pflanzen. Die T₃ Körner homozygoter PS/BA-T₂-Linien wurden im Stadium der Teigreife und Reife geerntet. Anhand der im Stereomikroskop sichtbaren GFP-Fluoreszenz wurden die Körner in die Kategorien „keine“, „mittlere“ und „starke“ GFP-Fluoreszenz eingeteilt.

Quantitative Analyse der GFP-Fluoreszenz in unreifen und reifen Gerstenkaryopsen

Für eine detaillierte Untersuchung des Zusammenhanges von T-DNA Kopienzahl und der Expression des Reportergens *GFP* wurde neben den visuellen Schätzungen auch eine quantitative Messung der GFP-Fluoreszenz in Extrakten aus unreifen und reifen Gerstenkaryopsen durchgeführt. Setzt man die GFP-Fluoreszenz im Pflanzenextrakt in Bezug zum Gehalt an löslichem Protein, kann eine „relative GFP-Fluoreszenz“ als quantitatives Maß für die Menge an GFP ermittelt werden.

Die Ergebnisse des quantitativen GFP-Fluoreszenztests an transgenen Körnern der PS/BA-Linien im Vergleich zur nicht transgenen Gerste cv. Igri (wt) sind in der Abb. C-32 dargestellt und stimmen im Prinzip mit den Ergebnissen aus der visuellen Bonitur der GFP-Fluoreszenz überein.

Die quantitative GFP-Fluoreszenzanalyse zeigte, dass die relative GFP-Fluoreszenz in den unreifen Körnern einer Linie weniger stark streut als in reifen Körnern. Zwischen einzelnen reifen Körnern der Linie PS 379 (drei T-DNA-Kopien) wurde beispielsweise eine Streuung der GFP-Fluoreszenzwerte um den Faktor 1000 beobachtet (Abb. C-31 „Vollreife“), während bei unreifen Körnern derselben Linie die Streuung unter dem Faktor 10 lag (Abb. C-31 „Teigreife“).

Die relative GFP-Fluoreszenz in unreifen Körnern der PS/BA-Linien zeigte im Bereich von eins bis drei T-DNA Kopien (PS 413, PS 377, PS 394; PS 389, PS 413) keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) auf. Die höchste relative GFP-Fluoreszenz von unreifen Körnern wurde in der Linie PS 379 (drei T-DNAs) detektiert, die auch entsprechend der visuellen Bonitur die stärkste Fluoreszenz aufwies. Deutlich geringer war die relative GFP-Fluoreszenz der PS/BA-Linien mit vier und fünf T-DNA Kopien (PS 387, BA 51 und PS 403). Die geringste relative GFP-Fluoreszenz wies dabei die Linie PS 403 (fünf T-DNAs) auf. Dennoch war in allen Extrakten aus unreifen Körnern der verschiedenen PS/BA-Linien GFP-Fluoreszenz detektierbar.

Die Ergebnisse der Messung der relativen GFP-Fluoreszenz an reifen Körnern der PS/BA Linien wiesen alle untereinander signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) auf (Abb. C-32). Hier konnte in keinem Fall eine einheitlich starke GFP-Fluoreszenz an allen reifen Körnern einer Linie innerhalb der PS/BA Linien gemessen werden. Die höchste gemessene relative GFP-Fluoreszenz wurde in einzelnen reifen Körnern der Linien PS 379 (drei T-DNA Kopien) und 403 (fünf T-DNA Kopien) bestimmt. Dennoch wurde auch in diesen Linien in einigen reifen Körnern eine geringe relative GFP-Fluoreszenz gemessen.

Eine einheitlich geringe relative GFP-Fluoreszenz wurde in reifen Körnern der Linie BA 49 mit fünf T-DNA Kopien gefunden, was ebenfalls mit dem Ergebnis der visuellen Bonitur übereinstimmt.

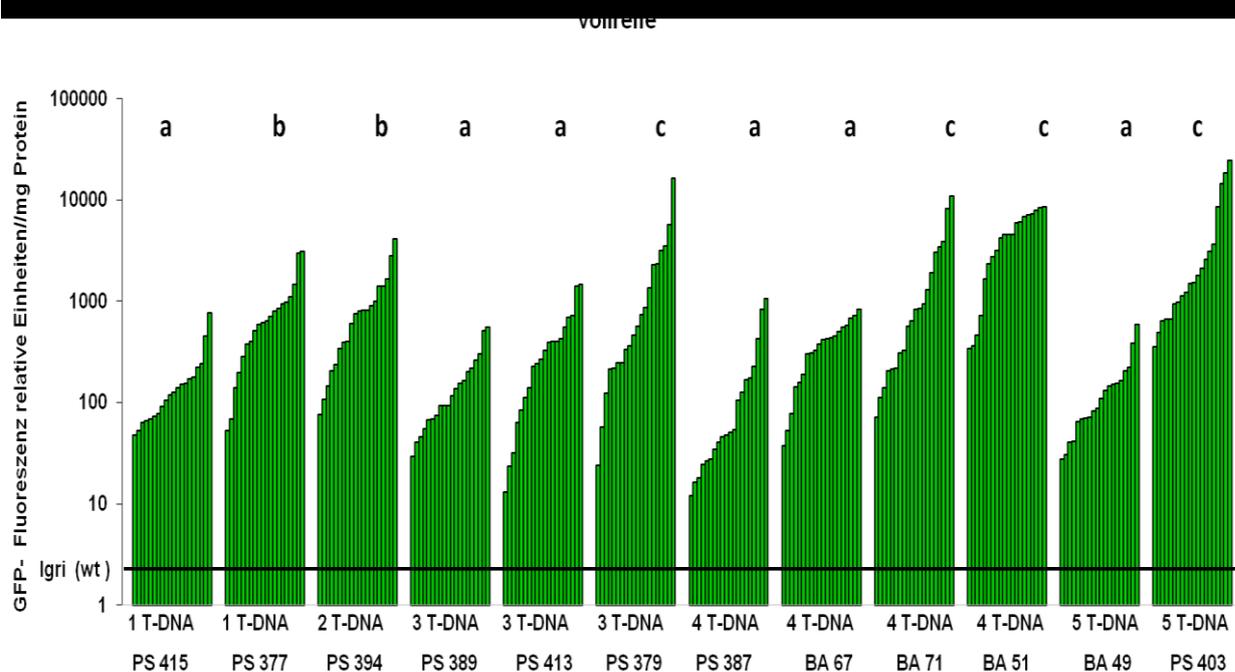
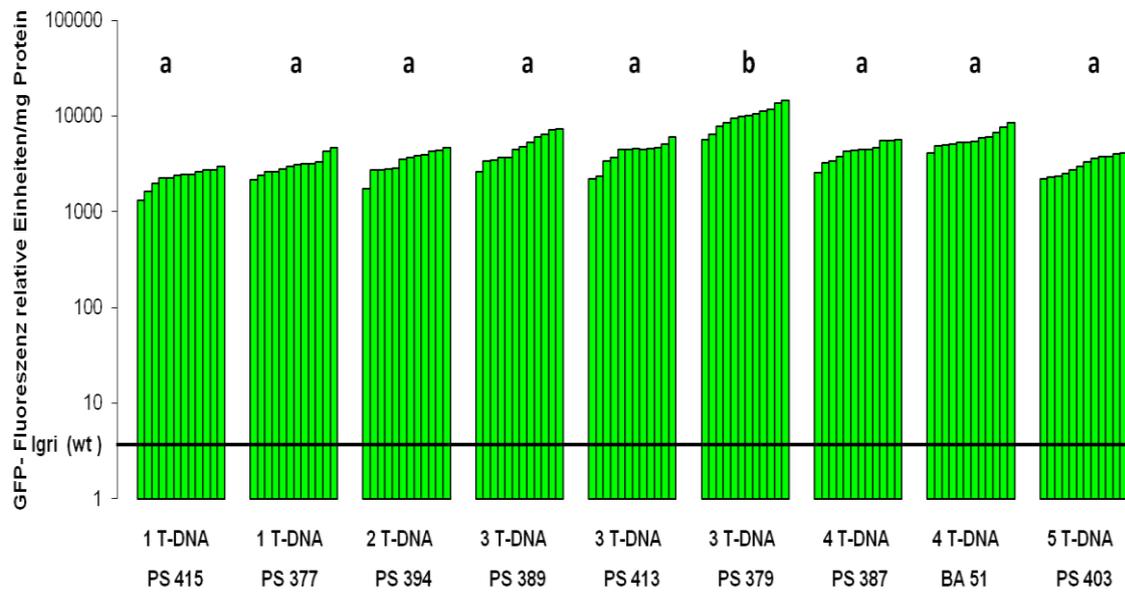


Abbildung C-32: Vergleich der relativen GFP-Fluoreszenz in unreifen und reifen Gerstenkörnern von homozygot transgenen PS/BA Linien im Vergleich zu nicht transgener Gerste der Sorte Igrri. Die Messung erfolgte je Linie an 12 unreifen Körnern sowie an 20 reifen Körnern. Die GFP-Fluoreszenz der einzelnen Messwerte ist auf einer logarithmischen Skala abgebildet. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen stehen für signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Linien ($P < 0,05$).

Molekulare Untersuchungen zur post-transkriptionellen Geninaktivierung im Endosperm von transgener Gerste

Der Nachweis von siRNAs mit Homologie zur kodierenden Sequenz des *GFP*-Gens wäre ein guter Beweis für die post-transkriptionelle Geninaktivierung im Endosperm von transgener Gerste gewesen.

Daher wurde versucht, GFP-spezifische siRNAs durch eine Northern-Hybridisierung nachzuweisen (Abb. C-33). Der Versuch wies jedoch weder für siRNAs aus reifen Gerstenkörnern noch für eine mit aufgetragene Kontrolle von siRNAs aus einer transgenen *Arabidopsis*-Linie, die regelmäßig PTGS eines *GFP* Reportergens zeigt (Renate Schmidt, persönliche Mitteilung) ein spezifisches Signal von 21 nt GFP siRNA auf.

Vermutlich liegt die Menge der siRNA in transgenem reifem Gerstenkornmaterial unterhalb der möglichen Nachweisgrenze der verwendeten Methode. Ein Nachweis der post-transkriptionellen Geninaktivierung im Endosperm von reifen Gerstenkörnern mittels siRNAs war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

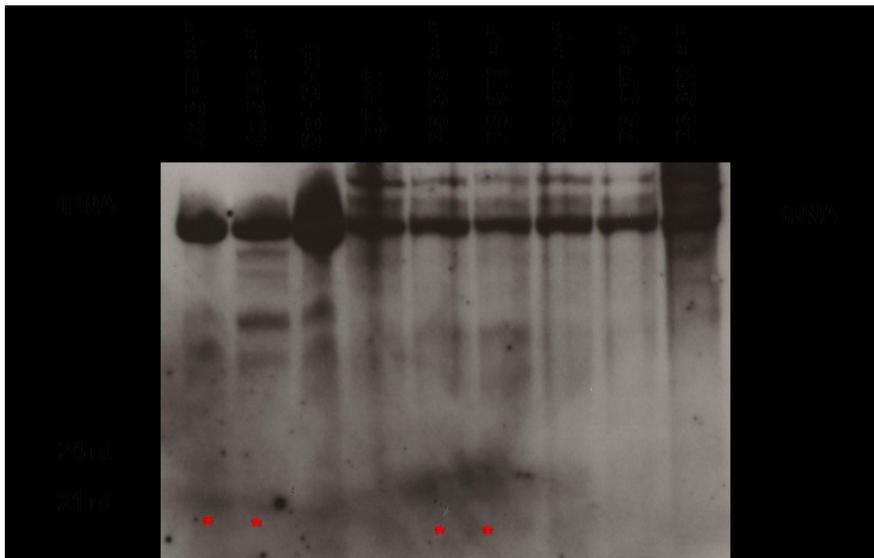


Abbildung C-33: Versuch des Nachweises von GFP-siRNA in homozygot transgenen Gersten Linien. Als Kontrolle wurden siRNA-Präparationen aus Blättern von GFP-transgenen sowie nicht transgenen *A. thaliana* Pflanzen mit analysiert. Für transgene Gersten-Linien wurden siRNA-Präparationen aus reifen Körnern aufgetragen. Linien mit starker GFP-Fluoreszenz (kein PTGS?) wurden mit "+", Linien mit keiner GFP-Fluoreszenz (PTGS?) wurden mit "-" markiert. Als Kontrollen wurden siRNA-Präparationen aus nicht-transgenen Körnern von Gerste der Sorte Igri verwendet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer GFP 3'end *sense* Sonde. Linien mit möglicherweise detektierbaren GFP-siRNA Signalen wurden mit einem Stern (*) markiert.

D Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Expression von rekombinanten Proteinen im Endosperm diploider Gerste (*Hordeum vulgare* L.) Mechanismen der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung unterliegt. Eine Kollektion transgener Linien mit unterschiedlichen T-DNA Kopienzahlen wurde hergestellt und bezüglich der Endosperm-spezifischen Expression von GFP als Modellprotein und des Auftretens von siRNAs als molekulare Marker der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung untersucht.

Zur Klärung des Mechanismus der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung wurde parallel in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in einem revers-genetischen Ansatz die Rolle verschiedener RNA-abhängiger RNA-Polymerasen (RDRs) analysiert. Nicht funktionelle Allele von *rdr2*, *rdr5* und *rdr6* wurden in ein Transgen-basiertes Reportersystem für die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung eingeführt und auf ihren Effekt auf die GUS Reporter-gen-Inaktivierung, Bildung von Reporter-gen-abgeleiteten siRNAs und Reporter-gen-assoziiierter DNA-Methylierung analysiert.

D.1 Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung von Transgenen in *A. thaliana*

D.1.1 4xGUS Pflanzen zeigen Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung

Transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die für ein T-DNA Konstrukt mit zwei Kopien eines pro35S-GUS-OC-Ster Reportergens hemizygot waren (zwei GUS Kopien, 2xGUS), wiesen unter Kurztag-Bedingungen bis zum Alter von 9 Wochen eine weitgehend gleichförmige hohe GUS-Expression auf. Pflanzen, die für dieselbe T-DNA homozygot waren (vier GUS Kopien, 4xGUS) zeigten dagegen nach 3, 6 und 9 Wochen Kultur eine deutliche Variabilität der GUS-Expression. Die meisten der analysierten Einzelpflanzen wiesen dabei entweder eine gleichförmige hohe GUS-Expression oder eine gleichförmige ca. 100-fach verringerte GUS-Expression auf. In nur wenigen Individuen wurden Zwischenwerte festgestellt. Zudem war die GUS Gen-Inaktivierung progressiv, d. h., mit zunehmendem Alter der 4xGUS Pflanzen konnte in einem zunehmenden Anteil der Pflanzen eine verminderte GUS-Expression festgestellt werden (C.1.1).

GUS siRNAs in *antisense*-Orientierung und ausgedehnte DNA-Methylierung im 3'-Bereich der codierenden Sequenz des GUS-Gens wurden in 4xGUS Pflanzen, jedoch nicht in 2xGUS Pflanzen, nachgewiesen. (C.1.1 und Abb. C-6).

Hohe Variabilität der Reporter-Gen-Expression, Progressivität der Gen-Inaktivierung während der Entwicklung, siRNAs mit Homologie zu Reporter-Genen und DNA-Methylierung der transkribierten Sequenzen von Reporter-Genen sind typische Eigenschaften der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung (Matzke und Birchler 2005). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Verminderung der GUS-Expression in den 4xGUS Pflanzen auf post-transkriptioneller Gen-Inaktivierung beruht.

Das im Vergleich zu 2xGUS Pflanzen wesentlich effektivere Einsetzen der Gen-Inaktivierung in 4xGUS Pflanzen ist am einfachsten mit einer Abhängigkeit von der Menge an GUS Transkripten zu erklären. Das Überschreiten eines vorgegebenen Schwellenwertes an Transkripten als Auslöser der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung wurde bereits für eine Reihe von Fällen postuliert (Dehio und Schell 1994, Vaucheret *et al.* 1998, Schubert *et al.* 2004). Die Untersuchungen von Schubert *et al.* (2004) an Linien mit unterschiedlichen Reporter-Genen zeigten zudem, dass der Schwellenwert Transkript-spezifisch ist. Drei oder mehr Kopien des GUS-Gens, fünf Kopien des GFP-Gens und neun Kopien des SPT-Gens unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters induzieren eine post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung des jeweiligen Reporter-Gens. Die Beobachtung von GUS-Inaktivierung in 4xGUS, aber nicht in 2xGUS Pflanzen, stimmt mit den von Schubert *et al.* (2004) gemachten Angaben gut überein. Die ausgewählte transgene *A. thaliana* Linie zeigt alle typischen Anzeichen für eine Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung des enthaltenen GUS Reporter-Gens und eignet sich somit für die genetische Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen.

D.1.2 Beteiligung von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung

Für viele Organismengruppen ist das Auftreten von PTGS oder vergleichbaren Mechanismen bekannt oder es konnten zumindest Mitglieder von einigen der an diesen Mechanismen beteiligten Genfamilien identifiziert werden. Eine wichtige Komponente im PTGS sind RNA-abhängige-RNA-Polymerasen (RDRs), die aus einzelsträngiger RNA doppelsträngige RNA herstellen können. Dabei ist noch nicht klar, wie diese Enzyme unter den vielen in einer Zelle vorhandenen einzelsträngigen RNAs ihre spezifischen Substrate auswählen. Die Spezifität könnte von siRNAs vermittelt werden. Von Vaistij *et al.* (2002) wurde vorgeschlagen, dass eine Interaktion zwischen *antisense* RNAs und *sense* mRNA letztere strukturell verändert und damit für RNA-abhängige-RNA-Polymerasen zugänglich macht.

In *A. thaliana* wurden sechs *RDR* Gene (*RDR1* bis *RDR6*) identifiziert, für die zum Teil auch schon Funktionen beschrieben wurden (zusammengefasst in Wassenecker und Kruczal

2006). Es war zu Beginn der Arbeiten nicht bekannt, welche von diesen RDRs an der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Geninaktivierung beteiligt sind. Daher lag es nahe, in einem revers-genetischen Ansatz den Einfluss von nicht funktionellen *rdr2*, *rdr5* und *rdr6* Allelen auf das Transkriptmengen-abhängige PTGS in *A. thaliana* zu untersuchen. Hierfür wurden in dieser Arbeit die Allele der *rdr2-gk*, *rdr5-gk* und *rdr6-11* Mutanten näher charakterisiert (Abb. C-8, C-10 und C-11) und durch Kreuzung in die transgene Reporterlinie GUS 2xr 126 eingebracht. Nach Daxinger *et al.* 2008 kann bei der Verwendung von T-DNA Insertionslinien mit komplexer Transgen-Struktur eine *in trans* wirkende transkriptionelle Gen-Inaktivierung von Reportertransgenen beobachtet werden, wenn beide Transgene homologe Promotor-Sequenzen enthalten. Da sowohl das Transgen in Linie GUS 2xr 126 wie auch die Transgene in GABI-Kat T-DNA Insertionslinien pro35S-Sequenzen enthalten, wurde zur Vermeidung solcher störenden Effekte sichergestellt, dass die verwendeten GABI-Kat Linien nur eine T-DNA Kopie (*rdr2-gk* bzw. *rdr5-gk*) enthielten (Tab. C-1 und Abb. C-7). Alle verwendeten *rdr6* Allele beruhten nicht auf T-DNA Insertionen, sondern auf Punktmutationen, sodass für diesen Fall ein Problem wegen multipler T-DNA Kopien ausgeschlossen war.

Unter den aus den Kreuzungen erhaltenen F₂ Familien wurden Pflanzen identifiziert, die sowohl für die *rdr*-Allele als auch die Reporter-T-DNA (4xGUS) homozygot waren (C.1.2, Abb. C-12.). Histochemische und quantitative GUS-Tests an von diesen homozygoten Linien erhaltenen F₃ Pflanzen zeigten für die *rdr2-gk*, *rdr5-gk* und *rdr6*-Allele unterschiedliche Ergebnisse.

Rolle von RDR2

4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen zeigten sowohl bezüglich der räumlichen Verteilung der GUS-Expression nach 9 Wochen als auch hinsichtlich der Höhe der GUS-Aktivität in diversen Entwicklungsstadien eine größere Streuung (C.1.2 und Abb. C-14) als 4xGUS (Wildtyp *RDR2*), 4xGUS *rdr6-11* und 4xGUS *rdr5-gk* Pflanzen. Gleichwohl zeigten einige der 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen eine ähnlich ausgeprägte Inaktivierung der GUS Expression wie 4xGUS Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass RDR2 an der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung eher nur am Rand beteiligt ist. RDR2 könnte eine Funktion bei der Koordination der Gen-Inaktivierung in den verschiedenen Teilen einer Pflanze ausüben.

Es ist bekannt, dass sich lokal, zum Beispiel in einem Blatt, ausgelöstes PTGS über ein mobiles Signal in andere Teile einer Pflanze ausbreiten kann (Voinnet und Baulcombe 1997). Die systemische („Langstrecken-“) Ausbreitung dieses mobilen Signals erfolgt über das vaskuläre System insbesondere in den Siebröhren des Phloems. Die („Kurzstrecken-“)

Ausbreitung von Zelle zu Zelle erfolgt hingegen über Plasmodesmata. RDR2 ist für die Ausbreitung der Gen-Inaktivierung sowohl über die Kurz- als auch die Langstrecke essenziell (Dunoyer *et al.* 2007, Brosnan *et al.* 2007). Es ist zu vermuten, dass die im Rahmen dieser Arbeit in 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen beobachtete hohe Variabilität der GUS Inaktivierung auf einen Defekt bei der Bildung oder beim Empfang des mobilen Signals zurückzuführen ist (Abb. D-1).

In 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen, die eine geringe GUS-Aktivität zeigten, wurden 21 nt siRNAs mit Homologie zum GUS Reportergen nachgewiesen, während in 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen, die eine hohe GUS-Aktivität zeigten, keine siRNAs detektiert werden konnten (C.1.2 und Abb. C-15). Des Weiteren zeigten die 4xGUS *rdr2-gk* Pflanzen eine deutliche DNA-Methylierung des GUS Reportergens, die sich nicht von der in 4xGUS Pflanzen unterschied (C.1.2 und Abb. C-17). RDR2 ist für die Methylierung von einigen endogenen Sequenzen im Genom von *Arabidopsis thaliana* essenziell (Chan *et al.* 2004, Xie *et al.* 2004). Der fehlende Einfluss der Mutation in *rdr2-gk* auf die Methylierung des GUS Reportergens zeigt jedoch, dass RDR2 bei der DNA Methylierung im Zusammenhang mit der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung keine entscheidende Rolle spielt.

Rolle von RDR6

Im Gegensatz zu RDR2 ist RDR6 für die Transkriptmengen-abhängige post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung essenziell. 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen wiesen nach 9 Wochen Entwicklung im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen durchgängig ca. 1000-fach erhöhte GUS-Aktivitätswerte auf (C.1.2 und Abb. C-14).

In 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen konnten zudem keine GUS-abgeleiteten siRNAs detektiert werden und bei den sechs analysierten 4xGUS *rdr6-11* Einzelpflanzen wurde eine gegenüber 4xGUS Pflanzen deutlich reduzierte DNA-Methylierung gefunden (C.1.2, Abb. C-15 und C-17).

Eine vergleichbar wichtige Rolle spielt RDR6 in anderen Systemen, die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung zeigen. Dalmay *et al.* (2000) und Mourrain *et al.* (2000) identifizierten im Jahr 2000 zeitgleich in unabhängigen Mutagenese-Ansätzen RDR6 als einen für das PTGS von Reportertransgenen essenziellen Faktor.

RDR6 spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung in jeder Zelle (Abb. D-1). Aberrante Transkripte werden durch die Aktivität von RDR6 in doppelsträngige RNAs umgewandelt, die durch DICER (DCL4) in siRNAs (21 nt) gespalten werden (Himber *et al.* 2003, Dunoyer und Voinnet 2008). Diese siRNAs werden durch ein ARGONAUTE-Protein (AGO1) gebunden und dienen als spezifisches Signal für die endonukleolytische Spaltung von mRNA mit Sequenzhomologie zu den

siRNAs. Zumindest ein Teil der Spaltprodukte der mRNA kann wieder als Substrat der RDR6 dienen, so dass sich der Prozess der mRNA-Spaltung selbst erhalten oder sogar verstärken kann (Sijen *et al.* 2001).

Es ist jedoch noch nicht klar, wie bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung die initiale aberrante RNA gebildet wird, die den Prozess in Gang bringt. Luo und Chen 2007 vermuten nicht korrekt terminierte Transkripte als Auslöser. Nach dem Schwellenwert-Modell (Schubert *et al.* 2004) werden beim Überschreiten einer bestimmten Transkriptkonzentration neben der normalen mRNA auch vermehrt fehlerhafte Transkripte gebildet. Eine endgültige Klärung dieses Zusammenhanges ist jedoch noch offen.

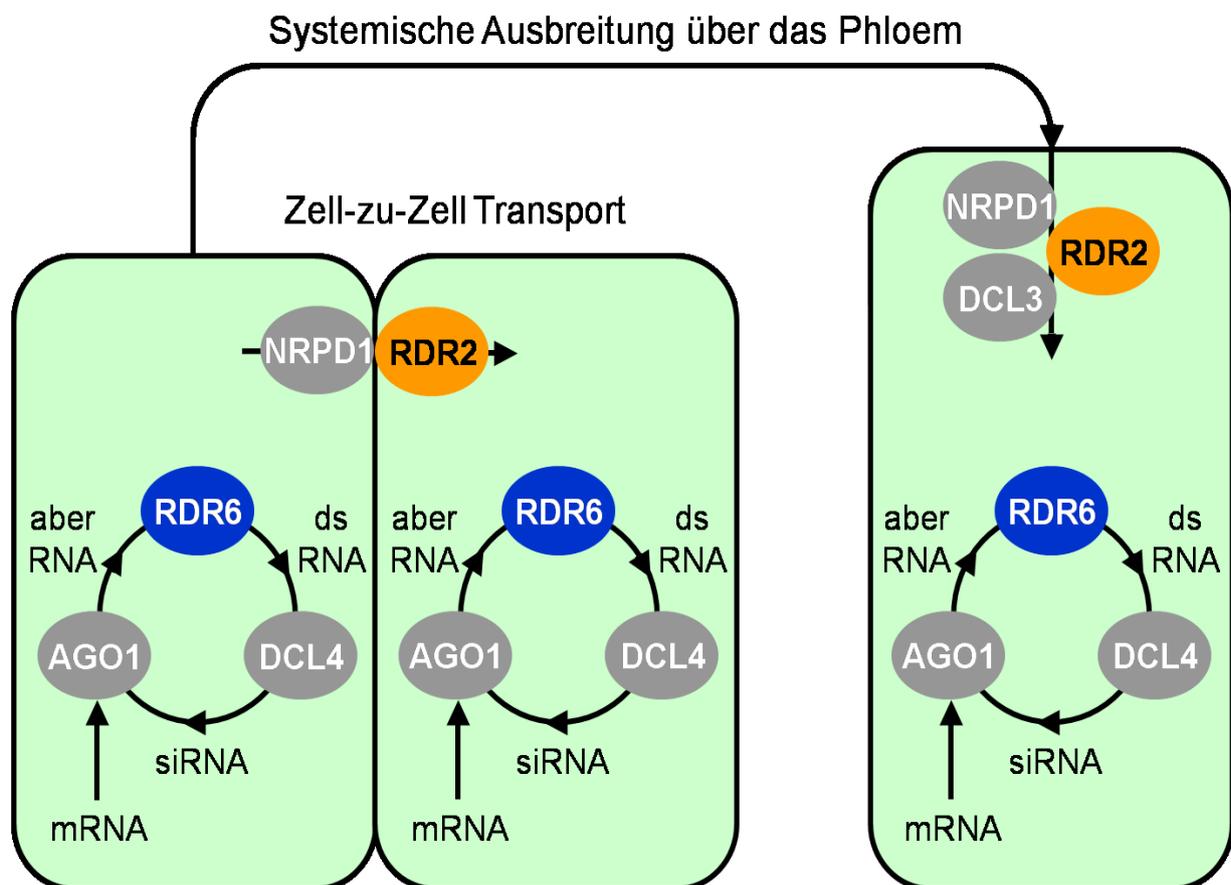


Abb. D-1: Rollen von RDR2 und RDR6 bei der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung (in Anlehnung an Dunoyer *et al.* 2007, Brosnan *et al.* 2007). RDR2, RDR6: RNA-abhängige-RNA-Polymerase, wandeln einzelsträngige in doppelsträngige RNA um; aberRNA: aberrante (fehlerhafte) RNA; DCL4, DCL3: DICER LIKE Proteine, prozessieren doppelsträngige RNA (dsRNA) in 21 beziehungsweise 24 nt lange short interfering RNA (siRNA); AGO1: Protein der ARGONAUTE Familie, spaltet mRNA (messenger RNA) in Kooperation mit einer siRNA, und NRPD1: DNA-abhängige RNA Polymerase IV.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von drei verschiedenen *rdr6* Allelen auf die GUS Inaktivierung in 4xGUS Pflanzen untersucht (C.1.2 und Abb. C-20). 4xGUS *rdr6-11* Pflanzen zeigten keine GUS Inaktivierung. 4xGUS *rdr6-13* Pflanzen zeigen dagegen eine nur teilweise Aufhebung der GUS-Gen-Inaktivierung, während die GUS Inaktivierung in 4xGUS *rdr6-14* Pflanzen nicht von jener der 4xGUS Pflanzen zu unterscheiden war.

Mutante *rdr6-11* trägt eine *nonsense*-Mutation nahe des N-Terminus des codierten Proteins. Daher kann kein funktionelles RDR6 Translationsprodukt mehr entstehen. Mutante *rdr6-13* trägt eine *missense*-Mutation in der Nähe des C-Terminus. Wahrscheinlich entsteht bei dieser Mutante zwar ein vollständiges RDR6 Protein, das aber nur eingeschränkte Aktivität oder Stabilität besitzt. *rdr6-14* hat eine *nonsense*-Mutation nahe am C-Terminus des codierten Proteins, es entsteht daher ein nur leicht verkürztes Protein, das offenbar noch voll funktionsfähig ist (Abb. C-10).

Mögliche Rolle der RDR5

4xGUS *rdr5-gk* Pflanzen zeigten nach 9 Wochen Entwicklung ausgeprägte GUS-Expression und gegenüber 4xGUS Pflanzen deutlich erhöhte GUS-Aktivitätswerte. Der Effekt des *rdr5-gk* Allels ist mit dem des *rdr6-11* Allels vergleichbar (C.1.2 und Abb. C-16). In 4xGUS *rdr5-gk* Pflanzen mit hoher GUS-Aktivität konnten keine GUS-abgeleiteten siRNAs nachgewiesen werden (Abb. C-15). Deutlich unterschiedliche Ergebnisse zeigte die Analyse der DNA-Methylierung des GUS Reportergens in sechs individuellen 4xGUS *rdr5-gk* Pflanzen. Es wurden sowohl Individuen mit reduzierter als auch mit starker DNA Methylierung gefunden (Abb. C-17).

Diese Ergebnisse deuten im Kontext der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung für RDR5 auf eine ähnliche Funktion wie für RDR6 hin. Bisher wurden noch keine Funktionen für RDR5 beschrieben. Interessanterweise wird RDR5 hauptsächlich in Samen exprimiert (Schmid *et al.* 2005). Eine weitere Analyse steht noch aus. Aufgrund der ähnlichen Effekte von *rdr5-gk* und *rdr6-11* auf die Gen-Inaktivierung sollten RDR5 und RDR6 nicht funktionell redundant sein, sondern möglicherweise nacheinander im selben Pfad wirken. Dies ließe sich durch Herstellung einer 4xGUS *rdr5 rdr6* Doppelmutante klären.

D.2.1 Homozygot-transgene Gerstenpflanzen mit verschiedenen GFP-Kopienzahlen

Pflanzen bieten verschiedene Vorteile bei der Herstellung rekombinanter Proteine (Übersichten bei Giddings 2001, Teli und Timko 2004). Es gibt aber auch Einschränkungen. Die nötige Vorlaufzeit (u. a. für die Regeneration der Pflanzen und die Herstellung homozygoter Linien) und die entstehenden Produktionskosten müssen bei der Wahl eines geeigneten pflanzlichen Expressionssystems beachtet werden (Übersicht bei Stoger *et al.* 2002). Eine koordinierte Expression zweier oder mehrerer Transgene wäre aus biotechnologischer Sicht von großem Interesse.

Das Einbringen mehrerer Transgene kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen, zum Beispiel durch (ggf. sukzessive) Kreuzung unterschiedlicher transgener Individuen (Nawrath *et al.* 1994), durch Vereinigung aller gewählten Gene auf einer einzigen, zur Transformation verwendeten DNA-Sequenz (Jach *et al.* 1995, Leech *et al.* 1998) oder durch die gleichzeitige Transformation mit mehreren Konstrukten (Chen *et al.* 1998, Maqbool und Christou 1999). Neben der Expression von rekombinanten Proteinen ist biotechnologisch vor allem auch die gezielte Modifikation der Eigenschaften von Nutzpflanzen von Bedeutung. So wurde z. B. versucht, drei Gene des Provitamin A (β -Carotin)-Stoffwechsels im Reisendosperm zu exprimieren, um das ansonsten carotinfreie Endosperm mit Provitamin A anzureichern (Ye *et al.* 2000).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten transgenen Gerstenpflanzen wurden nach der etablierten Methode der Agrobakterien-vermittelten Transformation embryogener Pollenkulturen der Wintergerste (*cv.* Igri) erzeugt (Kumlehn *et al.* 2006). Die Expression des GFP-Reportergens im Endosperm erfolgte unter Verwendung eines samenspezifischen Promotors (α -Gliadin aus Weizen) mit T-DNA Konstrukt pSB262 (Abb. C-22). Da das Endosperm triploid ist, übersteigt in durch Selbstung erhaltenen Körnern die vorliegende effektive Kopienzahl von homozygot vorhandenen Sequenzen noch die Kopienzahl im diploiden somatischen Gewebe. Aufgrund der möglichen weiten Spreizung der effektiven Kopienzahl in genetisch spaltendem Material war die Verwendung homozygoter transgener Gerstenlinien mit Körnern mit wohldefinierter einheitlicher Reportergen-Kopienzahl in dieser Arbeit umso wichtiger.

Zu Beginn standen acht (PS) unabhängige transgene doppelhaploide Gerstenlinien zur Verfügung, zu denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere 35 (BA) Linien hinzugefügt wurden. In allen Linien wurde die Integration des GFP-Reportergens durch molekulare Analyse nachgewiesen. Durch Restriktionsspaltung und anschließende Gelblot-Hybridisierung mit einer GFP-spezifischen Sonde wurde die Anzahl der in Genom

integrierten T-DNA Kopien für eine Auswahl von Linien bestimmt. Unter den acht unabhängigen, homozygot transgenen PS-Linien wurden zwei PS-Linien mit einer (PS 377 und 415), eine Linie mit zwei (PS 394), drei Linien mit drei (PS 379, 389 und 413), eine Linie mit vier (PS 387) und eine Linie (PS 403) mit fünf T-DNA Kopien identifiziert (Abb. 24-A). Unter den BA-T₀-Linien wiesen hingegen 14 Linien (40 %) ein, sechs Linien (17 %) zwei, acht Linien drei (23 %), drei Linien (9 %) vier und eine Linie (3 %) fünf Transgenkopien auf (Abb. 24-B). Die Rate an erzeugten T-DNA Linien mit einer bzw. mehreren T-DNA Kopien ist vergleichbar mit anderen mit Agrobakterien erzielten Transformationsergebnissen in Gerste (Kumlehn *et al.* 2006, Hensel *et al.* 2008) und *A. thaliana* (Forsbach *et al.* 2003).

Für die acht PS-Linien und sieben ausgewählten BA-Linien wurde die Anzahl der integrierten T-DNA Kopien mit weiteren Hybridisierungssonden bestätigt. Des Weiteren wurde der durch die verwendete Methode des Gentransfers in embryogene Pollenkulturen unmittelbar erzielte homozygote Status der T-DNA Insertionen in der T₂-Generation der untersuchten transgenen PS und BA-Linien verifiziert (Abb. C-25). Die Untersuchungen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) zur Lokalisierung des Transgens der transgenen BA Linien konnte unter anderem für Linie BA 51 zeigen, dass sich die vier integrierten T-DNA Kopien in einem gemeinsamen Gen-Locus auf Chromosom 5H befinden (Abb. C-26 und Tab. C-3).

D.2.2 Korrelation zwischen Kopienzahl und Expression eines Reportergens im Endosperm von Gerste

Es sollte unter anderem die Frage geklärt werden, bis zu welcher maximalen Anzahl von T-DNA-Kopien noch keine post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung im Endosperm homozygot transgener Gerstenpflanzen zu beobachten ist, bzw., wie stark im Fall einer Gen-Inaktivierung die Transgenexpression im Endosperm in Abhängigkeit der Kopienzahl reduziert ist.

In unreifen Körnern homozygot transgener Gerstenlinien mit unterschiedlicher Anzahl von T-DNAs konnte, bezogen auf Linien mit einer T-DNA Kopie, sowohl im semiquantitativen (mikroskopischer Nachweis der GFP-Fluoreszenz) als auch im quantitativen GFP-Fluoreszenztest keine oder eine nur teilweise Inaktivierung der GFP-Expression im Endosperm beobachtet werden. Die höchste GFP-Fluoreszenz wurde im semiquantitativen wie auch im quantitativen GFP-Fluoreszenztest im Endosperm von unreifem Kornmaterial der Linie PS 379 mit drei T-DNA Kopien beobachtet.

Im Endosperm von reifem Kornmaterial von homozygot transgenen PS- und BA Gerstenlinien mit unterschiedlicher Anzahl von T-DNAs (eins bis fünf) wurde im Vergleich zum unreifen Körnern sowohl im semiquantitativen als auch im quantitativen GFP-Fluoreszenztest eine deutlich geringere bzw. keine nachweisbare GFP-Fluoreszenz festgestellt (Abb. D-2).

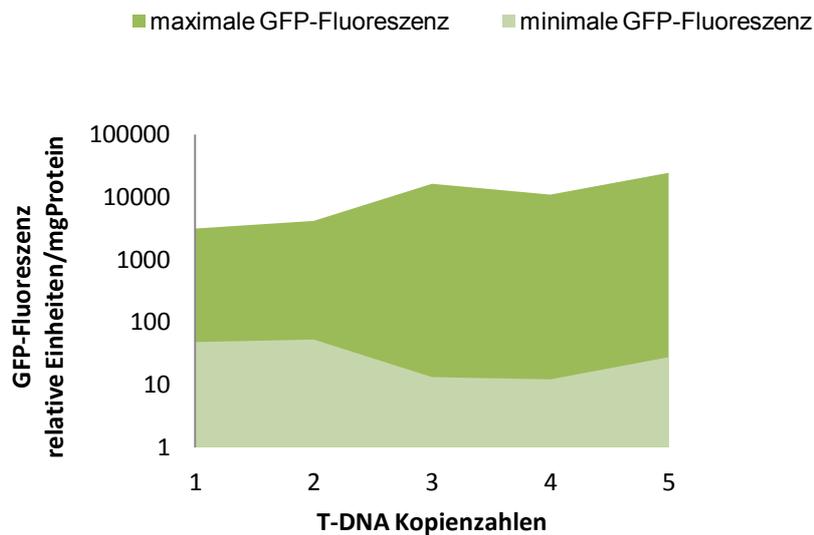


Abb. D-2: Vergleich der relativen GFP-Fluoreszenz und der T-DNA Kopienzahlen. Zusammenfassung der minimalen und maximalen GFP-Fluoreszenz der untersuchten homozygot transgen Gerstenlinien (BA/PS).

Entsprechend der Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen GFP-Fluoreszenztests wäre insbesondere für die Linie BA 49 eine Inaktivierung der GFP-Expression anzunehmen. Hier zeigten die Körner sowohl im mikroskopischen als auch im quantitativen GFP-Test im Vergleich zu den anderen Linien eine deutlich geringe GFP-Fluoreszenz. Diese Linie wäre ein geeignetes Objekt für den möglichen Nachweis von Transkriptmengen-abhängiger post-transkriptioneller Gen-Inaktivierung im Endosperm von transgenen Gerstenpflanzen (Abb. 31). Hier könnten ein Nachweis von siRNAs (21-24 nt) im Endosperm und GFP-Fluoreszenztests an durch Kreuzung mit nicht transgenen Pflanzen erzeugten Körnern mit reduzierter T-DNA Kopienzahl Aufschluss geben.

Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der integrierten T-DNA-Kopien und Schwankungen der Genexpression wurde bereits in einer Vielzahl von Studien unter Verwendung verschiedener Pflanzenarten beobachtet. Eine durch post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung verringerte Reporter-Gen-Expression in Anwesenheit einer hohen Anzahl von T-DNA-Kopien kann in vielen Fällen mit dem für *Arabidopsis thaliana* bereits diskutierten

Schwellenwert-Modell erklärt werden (Butaye *et al.* 2005, Deroles und Gardner 1988, Hobbs *et al.* 1993, Jorgensen *et al.* 1996). Dieses Modell geht davon aus, dass beim Überschreiten eines kritischen Levels eines Transkripts Mechanismen ausgelöst werden, die zum Abbau dieser RNA führen. Eine Erklärung wäre - wie bereits weiter oben ausgeführt - das Auftreten von nicht korrekt terminierter mRNA. Alternativ wäre denkbar, dass eine zu hohe Menge an Transkript eines Gens mit der Translation seiner mRNA interferiert. Das Auftreten von Codons für seltene tRNAs könnte bei einer zu geringen Menge der entsprechenden tRNAs zu einer weniger effizienten Translation führen und damit eine Erkennung der mRNA als „aberrante mRNA“ ermöglichen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die post-transkriptionelle Gen-Inaktivierung ist der Nachweis von siRNA (21 bzw. 24 nt). Ein direkter Nachweis von siRNAs des GFP Reportergens in den Karyopsen transgener Gersten wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht (Abb. C-33), konnte aber, wahrscheinlich aufgrund technischer Hindernisse (z. B. hoher Stärkegehalt der Karyopsen, geringer Gehalt an siRNAs), nicht erbracht werden. Weiterführende Experimente müssen unternommen werden, um zu zeigen, in welcher Anordnung (z. B. *inverted repeat*) sich die multiplen T-DNA Kopien im Endosperm der Gerste befinden und ob die Transgene DNA Methylierung aufweisen.

Eine Bewertung der generierten doppelhaploiden Hybridlinien mit noch höheren Kopienzahlen (C.2.1 und Abb. C-28) sollte weitere Auskunft über die Abhängigkeit der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung im Gerstenendosperm von der vorhandenen Gendosis geben.

Die enorme Bedeutung der hohen Expression von Proteinen im Endosperm der Gerste zeigt sich bereits in der Anwendung. Kommerzielle Anbieter wie z. B. ORF-Genetics (www.orfgenetics.com) sind bislang sehr erfolgreich, besitzen aber noch ein gewaltiges Verbesserungspotenzial im Bereich der Kopienzahl und des Zeitpunkts der Ernte des transgenen Gerstenmaterials.

E Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war zu untersuchen, in welchem Umfang die Mechanismen der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung die Expression von rekombinanten Proteinen im Endosperm der Gerste (*Hordeum vulgare*) beeinflussen. In einem parallelen Ansatz wurden in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* Untersuchungen zum Mechanismus der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung durchgeführt.

Die Rollen verschiedener RNA-abhängiger RNA-Polymerasen (RDRs) bei der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung wurden in *A. thaliana* in einem revers-genetischen Ansatz untersucht. Hierfür wurden nicht-funktionelle *rdr2*, *rdr5* und *rdr6* Allele in ein Transgensystem (4xGUS) eingeführt, bei dem reproduzierbar eine Reporter-gen-Inaktivierung beobachtet werden kann. Die enzymatische GUS-Aktivität, DNA Methylierung der GUS-codierenden Sequenzen und GUS-abgeleitete siRNAs wurden in 4xGUS *rdr2*, 4xGUS *rdr5* und 4xGUS *rdr6* Pflanzen im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen analysiert.

4xGUS *rdr2* Pflanzen zeigten sowohl bezüglich der räumlichen Verteilung als auch der Höhe der GUS-Aktivität eine Reduktion der Gen-Inaktivierung. Zwischen individuellen 4xGUS *rdr2* Pflanzen zeigte die GUS-Aktivität eine größere Streuung als zwischen individuellen 4xGUS *rdr5*, 4xGUS *rdr6* oder 4xGUS Pflanzen. Des Weiteren konnten in 4xGUS *rdr2* Pflanzen DNA-Methylierung des GUS Reportergens und GUS-abgeleitete siRNAs nachgewiesen werden. Dies kann als Hinweis für eine Rolle von RDR2 bei der Erzeugung oder beim Empfang eines mobilen Inaktivierungssignals gedeutet werden.

4xGUS *rdr6* Pflanzen wiesen im Vergleich zu 4xGUS Pflanzen durchgängig um Größenordnungen höhere GUS-Aktivitäten auf. Zudem war in 4xGUS *rdr6* Pflanzen die DNA-Methylierung deutlich verringert und es konnten keine GUS-abgeleiteten siRNAs gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine zentrale Rolle der RDR6 bei der post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung.

4xGUS *rdr5* Pflanzen zeigten eine ähnlich hohe GUS-Expression wie 4xGUS *rdr6* Pflanzen. Es konnten keine GUS-abgeleiteten siRNAs nachgewiesen werden. Im Vergleich zu 4xGUS *rdr6* Pflanzen war die DNA Methylierung von GUS Sequenzen in 4xGUS *rdr5* Pflanzen weniger reduziert und war zwischen individuellen Pflanzen sehr variabel. Damit konnte für RDR5 erstmalig eine Funktion beschrieben werden. Die Ergebnisse für RDR5 deuten auf eine ähnliche Funktion im Kontext der Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung wie für RDR6 hin.

Im zweiten experimentellen Ansatz wurde in Gerste eine Kollektion transgener Linien mit definierten, unterschiedlichen Kopienzahlen (eins bis fünf) eines GFP Reportergens unter der Kontrolle eines Endosperm-spezifischen Promotors hergestellt werden. Zur Klärung der Korrelation zwischen der GFP-Expression im Endosperm und der T-DNA-Kopienanzahl in

homozygot transgenen Gerstenpflanzen wurden semiquantitative und quantitative GFP-Fluoreszenztests von unreifen und reifen Gerstenkörnern durchgeführt. Die stärkste GFP-Expression bzw. Fluoreszenz wurde in Linie PS 379 mit 3 T-DNA Kopien festgestellt, die geringste GFP-Expression bzw. Fluoreszenz in der Linie BA 49 mit 5 T-DNA Kopien. Es gab somit keinen linearen Anstieg der GFP-Expression mit der Zahl der T-DNA Kopien. Dies kann als konsistent mit einer Transkriptmengen-abhängigen post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung im Endosperm der Gerste gedeutet werden. Der Versuch, diese Interpretation durch den Nachweis von GFP-abgeleiteten siRNAs zu untermauern, war leider aufgrund von technischen Problemen nicht erfolgreich.

Des Weiteren wurden Hybridlinien mit noch höheren T-DNA Kopienzahlen (bis zu acht T-DNA Kopien) generiert, die nun für weiterführende Studien zur post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung im Endosperm der Gerste zur Verfügung stehen.

Summary

The aim of this work was to investigate, to what extent the expression of recombinant proteins in the endosperm of barley (*Hordeum vulgare*) is affected by mechanisms of post-transcriptional gene silencing. At the same time, the mechanism of post-transcriptional gene silencing was studied in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

In a reverse-genetic approach in *A. thaliana*, the potential roles of RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) in transcript level-mediated post-transcriptional gene silencing were tested by the introduction of *rdr2*, *rdr5* and *rdr6* loss of function alleles to a transgenesystem (4xGUS) prone to undergo silencing. GUS-activity, DNA methylation of GUS coding sequences and GUS-derived siRNAs were analysed in 4xGUS *rdr2*, 4xGUS *rdr5* and 4xGUS *rdr6* plants in comparison to 4xGUS wildtype plants.

4xGUS *rdr2* plants showed a reduction of gene silencing in terms of distribution and level of GUS activity. The variation of GUS activity among individual 4xGUS *rdr2* plants was higher than among individual 4xGUS *rdr5*, 4xGUS *rdr6* or 4xGUS plants. Distinct DNA methylation of the GUS reporter gene and GUS-derived siRNAs could still be identified in 4xGUS *rdr2* plants. In conclusion, these results are consistent with a role of RDR2 in the generation or perception of a mobile silencing signal.

4xGUS *rdr6* plants showed in comparison to 4xGUS plants consistently largely increased GUS-activity values. At the same time, DNA methylation of GUS sequences was clearly reduced in 4xGUS *rdr6* plants and GUS-derived siRNAs were no more detected. These results confirmed a central role of RDR6 in post-transcriptional gene silencing.

4xGUS *rdr5* plants showed GUS-activity values at similarly high levels as 4xGUS *rdr6* plants. No GUS siRNAs could be detected. In comparison to 4xGUS *rdr6* plants, DNA methylation of GUS sequences in 4xGUS *rdr5* was less reduced and varied more among individual plants. Thus, for the first time, a function could be assigned to RDR5. The results suggest for RDR5 a similar function in the context of the transcript-level-dependent post-transcriptional gene inactivation as for RDR6.

In the second experimental approach, a collection of transgenic barley lines with well defined, different copy numbers (one to five) of a GFP reporter gene under the control of an endosperm-specific promoter was generated. To clarify the correlation between T-DNA copy number and GFP-expression in the endosperm of these homozygous transgenic barley plants, semi-quantitative and quantitative GFP-fluorescence tests of immature and mature barley grains were performed. GFP-expression or fluorescence was the strongest in line of PS 379 with 3 T-DNA copies and the lowest in line BA 49 with 5 T-DNA copies. This can be taken as a hint for operation of transcript level-mediated post-transcriptional gene silencing in

barley endosperm. Nevertheless, an approach to support this interpretation by the detection of GFP-derived siRNAs failed for technical reasons.

In addition, hybrid lines with even higher T-DNA copy numbers (up to eight T-DNA copies) were generated and are now available for further studies of post-transcriptional gene silencing in barley endosperm.

F Literaturnachweis

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. und Mukherjee, S. K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 657-685.

Alonso, J. M., et al., (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.

Assaad, F. F., Tucker, K. L. und Signer, E. R. (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (Rigs) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **22**: 1067-1085.

Baulcombe, D. C. (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 1833-1844.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M. und Carroll, B. J. (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *PNAS* **104**: 14741-14746.

Butaye, K. M. J., Goderis, I. J., Wouters, P. F., Poes, J. M., Delaure, S. L.; Broekaert, W. F., Depicker, A., Cammue, B. P. und De Bolle, M. F. C. (2004) Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J.* **39**: 440-449.

Butaye, K. M. J., Cammue, B. P. A., Delaure, S. L. und De Bolle, M. F. C. (2005) Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding* **16**: 79-91.

Chan, S. W. L., Zilberman, D., Xie, Z. X., Johansen, L. K., Carrington, J. C. und Jacobsen, S. E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* **303**: 1336.

Chen L., Marmey P., Taylor N.J., Brizard, J.P. und Espinoza C. (1998) Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotech* **16**: 1060-64.

Christensen, A. H. und Quail, P. H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* **5**: 213-218.

Chiu, W. L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. und Sheen, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* **6**: 325-330.

Coronado, M.J., Hensel, G., Broeders, S., Otto I. und Kumlehn J. (2005) Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 591-599.

Cuadrado, A. und Jouve, N. (2007) The nonrandom distribution of long clusters of possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Research* **15**: 711-720.

- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. und D. C. Baulcombe (2000)** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553.
- Daxinger, L., Hunter B., Sheikh M., Jauvion V., Gascioli V., Vaucheret H., Matzke M. A. und Furner I. (2008)** Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **13**: 4-6.
- Daxinger-Clemens, L., Kanno T., Bucher E., van der Winden W. J., Naumann U., Matzke A. J. M. und Matzke, M. A. (2009)** A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO J.* **28**: 48-57.
- De Neve, M.; De Buck, S., De Wilde, C., Van Houdt, H., Strobbe, I., Jacobs, A., Van Montagu, M. und Depicker, A. (1999)** Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* **260**: 582-592.
- De Wilde, C., Van Houdt, H., De Buck, S., Angenon, G., De Jaeger, G. und Depicker, A. (2000)** Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**: 347-359.
- Dehio, C. und Schell, J. (1994)** Identification of plant genetic-loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *PNAS* **91**: 5538-5542.
- Deroles, S. C. und Gardner, R. C. (1988)** Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **11**: 365-377.
- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., Voinnet, O. (2007)** Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature Genetics* **39**: 848-856.
- Dunoyer, P. und Voinnet, O. (2008)** Mixing and matching: the essence of plant systemic silencing? *Trends in Genetics* **24**: 151-154.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001)** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.
- Fire, A., Xu, S. Q.; Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Forsbach, A., Schubert, D., Lechtenberg, B., Gils, M. und Schmidt, R. (2003)** A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Molecular Biology* **52**:161-176.
- Franke, W. (1997)** "Nutzpflanzenkunde". Thieme Verlag.
- Fukui, K. Mamisugi, Y. und Sakai, F. (1994)** Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome* **37**: 105-111.

- Gan, S. und Amasino R. M. (1995)** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**: 1986-1988.
- Gerola, P. D., Mol, C. A., Newbigin, E. und Lush, W. M. (2000)** Regulation of LAT52 promoter activity during pollen tube growth through the pistil of *Nicotiana glauca*. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 347-352.
- Giddings, G. (2001)** Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 450-454.
- Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., Gahrtz M. und Kumlehn J. (2007)** Transgenic Barley in Fundamental Research and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal* **1**: 104-117.
- Guo, S. und Kempthorn, K. J. (1995)** PAR-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative SER/THR kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.
- Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H. und Tomotsune, H. (1995)** Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports* **14**: 329-334.
- Hamilton, A. J. und Baulcombe, D. C. (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hensel, G., Valkov, V., Middlefell-Williams, J. und Kumlehn J. (2008)** Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology* **165**: 71-82.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissard, G., Ritzenthaler, C. und Voinnet, O. (2003)** Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J.* **22**: 4523-4533.
- Hobbs, S. L., Warkentin, T. D. und DeLong, C. M. (1993)** Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.* **21**:17-26.
- Holtorf, S., Apel, K. und Bohlmann, H. (1995)** Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **29**: 637-646.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V. und Aravind, L. (2003)** Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Struct. Biol.* **3**:1.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, P., Leah, R., Schell, J. und Maas, C. (1995)** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic Tobacco. *Plant Journal* **8**: 97-109.
- Jefferson, R. A., Kavanagh T. A. und Bevan M. W. (1987)** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907.

- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q. D. und Napoli, C. A. (1996)** Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology* **31**: 957-973.
- Kato, A. Albert, P. S., Vega, J. M. und Birchler, J. A. (2006)** Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. *Biotechnic & Histochemistry* **81**: 71-78.
- Knäblein J. und McCaman M. (2003)** Modern Biopharmaceuticals - recombinant protein expression in transgenic plants. *Trends in Drug Discovery* **4**, 33-35.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. und Stam P. (2006)** Genetic analysis. *Methods Mol. Biol.* **323**: 65-77.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. und Loerz, H. (2006)** Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol.J.* **4**: 251-261.
- Lechtenberg, B., Schubert, D., Forsbach, A., Gils, M. und Schmidt, R. (2003)** Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant J.* **34**: 507-517.
- Leech M.J., May K., Hallard D., Verpoorte R., De Luca V. und Christou P. (1998)** Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Mol Biol* **38**: 765-74.
- Li, H. C. und Devaux, P. (2003)** High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* **164**: 379-386.
- Luo, Z. und Chen, Z. (2007)** Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 943-958.
- Manoharan, M. und Dahleen, L. S. (2002)** Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Reports* **21**: 76-80.
- Maqbool, S. B. und Christou, P. (1999)** Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Molecular Breeding* **5**: 471-480.
- Matzke, M. A. und Birchler, J. A. (2005)** RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics* **6**: 24-35.
- McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. und Kay, M. A. (2002)** Gene expression - RNA interference in adult mice. *Nature* **418**: 38-39.
- Mette, M. F., van der Winden J., Matzke, M. A. und Matzke, A. J. M. (1999)** Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J.* **18**: 241-248.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden J., Matzke, M. A. und Matzke, A. J. M. (2000)** Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**: 5194-5201.

- Mette, M. F., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Rovina, P., Matzke, M. A. und Matzke, A. J. M (2005)** Analysis of double-stranded RNA and small RNAs involved in RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Methods Mol. Biol.* **309**: 61-82.
- Metzlaff, M., Odell, M., Cluster, P. D. und Flavell, R. B. (1997)** RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase a silencing in *Petunia*. *Cell* **88**: 845-854.
- Misquitta, L. und Paterson, B. M. (1999)** Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *PNAS* **96**: 1451-1456.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A. und Vaucheret, H. (2000)** Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990)** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
- Nawrath, C., Poirier, Y. und Sommerville, C. (1994)** Targeting of the polyhydroxybutyrate gene in *petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *PNAS* **91**: 12760-12764.
- Pang, S. Z., DeBoer D. L., Wan Y., Ye G., Layton J. G., Neher M. K., Armstrong C. L., Fry J. E., Hinchee, M. A. W. und Fromm M. E. (1996)** An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* **112**: 893-900.
- Park, Y. D., Papp, I., Moscone, E. A., Iglesias, V. A., Vaucheret, H., Matzke, A. J. M. und Matzke, M. A. (1996)** Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal* **9**: 183-194.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L. und Poethig, R. S. (2004)** SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**: 2368-2379.
- Roche Diagnostics (2003)** "DIG Application Manual for Filter Hybridization" or "DIG Applikations-Handbuch für Filter Hybridisation".
- Romano, N. und Macino, G. (1992)** Quelling - Transient inactivation of gene-expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* **6**: 3343-3353.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003)** An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics: *Plant Mol. Biol.* **53**: 247-259.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: a laboratory manual 2nd edition. *New York, Cold Spring Harbor*.

- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001)** Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. New York, Cold Spring Harbor.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. und Lohmann, J. U. (2005)** A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* **37**: 501-506.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S. und Schmidt, R. (2004)** Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**: 2561-2572.
- Sessions, A. und Yanofsky, M. F. (1999)** Dorsoventral patterning in plants. *Genes Dev.* **13**: 1051-1054.
- Shrawat, A. K. und Lörz, H. (2006)** *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol. J.* **4**: 575-603.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. und Fire, A. (2001)** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476.
- Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gele electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- Stam, M., Mol, J. N. M. und Kooter, J. M. (1997)** The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* **79**: 3-12.
- Stoger, E., Sack, M., Perrin, Y., Vaquero, C., Torres, E., Twyman, R. M., Christou, P. und Fischer, R. (2002)** Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding* **9**: 149-158.
- Teli, N.P. und Timko, M.P. (2004)** Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **79**:125-145.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Sequence and analysis of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- van Blokland, R., ten Lohuis, M. und Meyer, P. (1997)** Condensation of chromatin in transcriptional regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Molecular and General Genetics* **257**: 1-13.
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. und Stuitje, A. R. (1990)** Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**: 291-299.
- Vaistij, F. E., Jones L. und Baulcombe, D. C. (2002)** Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**: 857-867.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T, Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Mourrain, P., Palauqui, J. C. und Vernhettes, S. (1998)** Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal* **16**: 651-659.

- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P. und Crete, P. (2004)** Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell* **16**: 69-79.
- Vickers, C. E., Xue, G. und Gresshoff, P. M. (2006)** A novel cis-acting element, ESP, contributes to high-level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter. *Plant Mol. Biol.* **62**:195-214.
- Voinnet, O. und Baulcombe, D. C. (1997)** Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553.
- Wassenegger, M., und Krczal, G. (2006)** Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**: 142-151.
- Waterhouse, P. M., Graham, H. W.und Wang, M. B. (1998)** Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *PNAS* **95**: 13959-13964.
- Waterhouse, P. M., Wang M. B. und Lough T. (2001)** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-842.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen S. E. und Carrington J. C. (2004)** Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants: *PLoS. Biol.* **2**: E104.
- Ye X., Al-Babili S., Kloti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. und Potrykus I. (2000)** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**: 303-5.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. und Grissem, W. (2004)** GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621-2632.

G Anhang

Tab. G-1: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Konzentration	Komponente
B5-Medium (pH 5,8)	0,31 % (w/v)	B5-Medium (Gamborg B5 Medium inkl. Vitamine)
	0,20 % (w/v)	Succhrose
Church-Gilbert- Hybridisierungspuffer	250 mM	Phosphatpuffer (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 ; pH 7,2)
	7 % (w/v)	SDS
	1 mM	EDTA
	10 mg/ml	BSA
<i>DIG1</i> -Puffer	150 mM	NaCl
	100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
	zusätzlich 0,3 % (v/v)	Tween® 20
<i>DIG2</i> -Puffer	150 mM	NaCl
	100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
	zusätzlich 1 % (w/v)	Roche Blocking Reagent
<i>DIG3</i> -Puffer	100 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
DNA-Extraktionspuffer	100 mM	Tris (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
	10 mM	EDTA (pH 8,0)
	0,5 % (w/v)	N-Laurylsarkosin
Denaturierungspuffer	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Ethidiumbromid-Färbelösung	0,5 x	TBE
	1 µg/ml	Ethidiumbromid
Neutralisierungspuffer	1,0 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	1,5 M	NaCl
PAGE-Ladepuffer	96% (v/v)	Formamid
	20 mM	EDTA
	1 mg/ml	Bromphenolblau
PCR-Ladepuffer	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylene cyanol
	30 % (v/v)	Glycerin
10xTBE	1,0 M	Tris
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	Na_2EDTA
20xSSC	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Na-citrat (pH 7,0)

Tab. G-2: 4-MU-Kalibrierungsreihe in 0,2 M Na₂CO₃

Hierfür wurde eine 10 mM 4-MU (0,02 g 4MU in 10 ml DMSO Lösen) Standardlösung hergestellt.

Volumen/Konzentration 4-MU-Lsg.	Volumen 0,2 M Na₂CO₃	Endkonzentration in 1 ml
10 µl/10 mM	990 µl	100 µM
50 µl/100 µM	950 µl	5 µM
10 µl/100 µM	990 µl	1 µM
500 µl/1 µM	500 µl	500 nM
500 µl/500 nM	500 µl	250 nM
200 µl/500 nM	800 µl	100 nM
500 µl/100 nM	500 µl	50 nM
500 µl/50 nM	500 µl	25 nM

G. 1 Expression der RDR-Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien

Mit zunehmender Nutzung von Microarrays steht in allgemein verfügbaren Datenbanken eine Vielzahl von Informationen zur Expression von Genen in verschiedenen Entwicklungsstadien oder in Reaktion auf diverse Reize zur Verfügung. Wie Abbildung G-1 zeigt, variiert die Expressionsstärke der einzelnen *RDR* Gene von *Arabidopsis thaliana* während einzelner Phasen der Entwicklung teilweise sehr deutlich (<https://www.genevestigator.rthz.ch/>; Zimmermann *et al.*, 2004).

Während *RDR2*, *RDR5* sowie *RDR6* in der frühen Keimlingsentwicklung noch eine gleiche mittlere Expression aufweist, zeigen sich in der späteren Entwicklung der Pflanze deutliche Unterschiede. *RDR2* und *RDR6* zeigen eine konstante mittlere Expression über die gesamte Pflanzenentwicklung hindurch, beim Übergang vom vegetativen Wachstum zur Blühphase kann aber ein Maximum beobachtet werden. *RDR5* (in der Abb. G-1 mit AtRDR3c bezeichnet) weist während der Pflanzenentwicklung meist eine ähnliche Expression wie *RDR2* auf, zeigt aber zusätzlich ein ausgeprägtes Maximum der Expression in reifen Schoten und keimenden Samen.

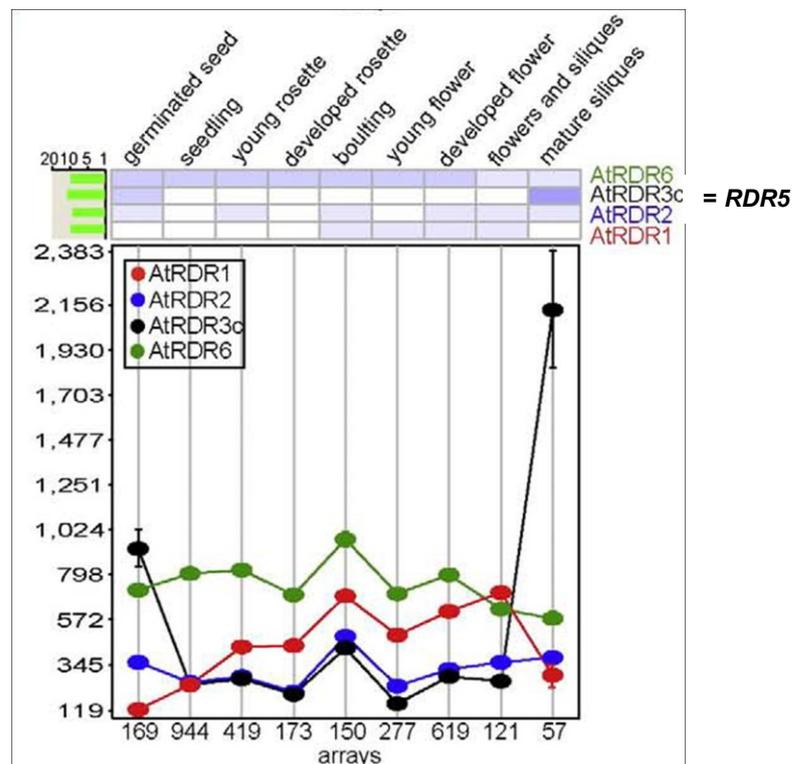


Abbildung G-1: Microarray-Daten zur entwicklungsabhängigen Expression der RDR Gene in *A. thaliana*. Die Microarray-Daten wurden dem Gene Chronologer der Genevestigator-Datenbank (<https://www.genevestigator.rthz.ch/>; Zimmermann *et al.*, 2004) entnommen. Die angegebenen Stadien beziehen sich nicht auf bestimmte Pflanzenorgane, sondern stellen symbolisch den Entwicklungsstand der Pflanze dar. Die Expressionsstärke der Gene wurde in unterschiedlichen Intensitäten der Blautöne dargestellt (dunkelblau= starke Expression des Gens und hellblau= schwache Expression des Gens)

G. 2 pSB262-Vektor

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Gerste würde das binäre Plasmid pSB262, das auf der Ligation 174 bzw. dem Vektor pAG-GFP basiert (Sylvia Broeders), verwendet.

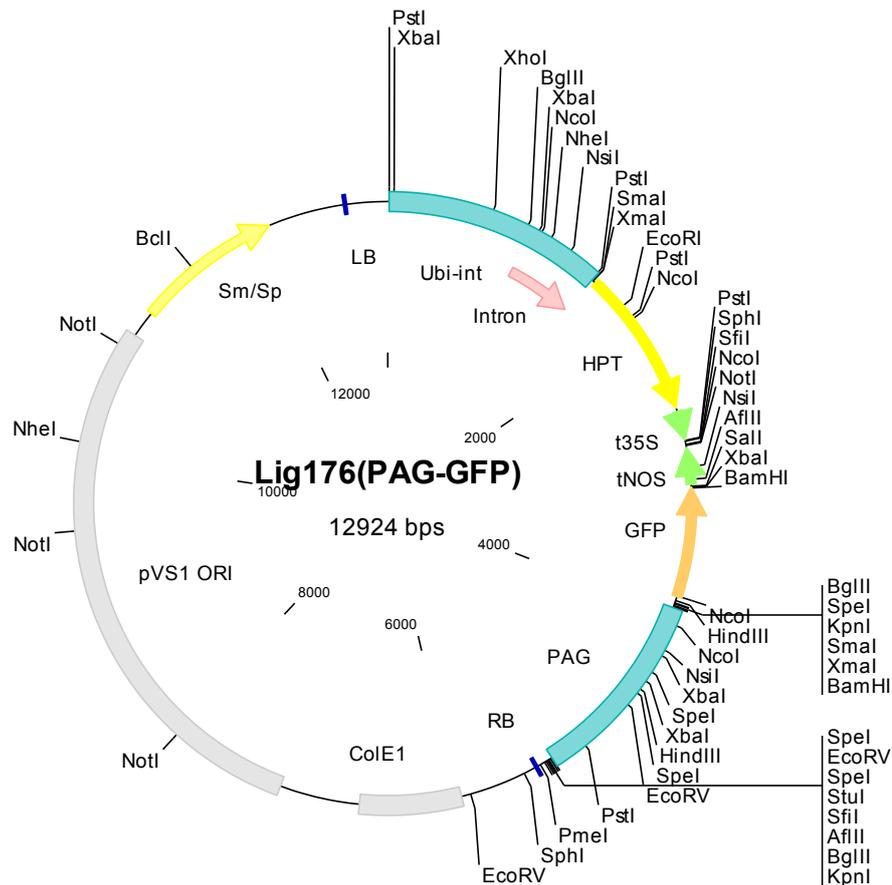


Abb. G-2: Schematische Darstellung des binären Plasmids pSB262. Ubi-int (Ubiquitin Promoter): 10 bp - 1517 bp; Intron: 997 bp - 1516 bp; HPT (Hygromycin-Resisten-Gen) 1544 bp - 2569 bp; t35S (35S Terminator) 2594 bp - 2795 bp; tNos (Terminator des Nopalinsynthasegens) 2847 bp - 3100 bp; GFP (Grün fluoreszierendes Protein) 3118 bp - 3876 bp; PAG (alpha-gliadin Promoter) 3955 bp - 5289 bp; RB (right border, rechte Grenzsequenz der T-DNA); ColE1 5967 bp - 6654 bp; pVS1 ORI 7203 bp - 10908 bp; Sm/Sp (Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz) 11092 bp - 12102 bp; LB (left border, linke Grenzsequenz der T-DNA) 12623 bp - 12646.

Sequenz von pSB262:

TCTAGTAGTCTGCAGTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATG
TCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTT
TATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTT
AGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGAC
TCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAA
TACTTCATCCATTTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTT
TTAGTACATCTATTTTTATTCTATTTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAATAAACTCTATTTTTAGTTTTTT
ATTTAATAATTTAGATATAAAAATAGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAACAATAACCTTTAAGA
AATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGT
CGATCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAG
CAGACGGCACGGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCGCTCCACCGTTGG
ACTTGCTCCGCTGTGCGCATCCAGAAATTGCGTGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGC
AGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTT
CGCTTTCCCTTCTCGCCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCAACCTC
GTGTTGTTGCGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTGCGCACCTCCG
CTTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCG
GTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAG
ATCCGTGCTGCTAGCGTTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACT
TGCCAGTGTCTCTTTGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATCT
AGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTA
TTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTTATTTGATC
TTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATAC
GCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGATGCTCACCCGTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCA
GGTCGAGGGCCCCGGGGGGCAATAAGATATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGCA
GAAGTTTCTGATCGAAAAGTTGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAA
TCTCGTGCTTTTACGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCG
ATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAA
GTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTG
TCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTGCGGAGGCCAT
GGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCATTCCGACCCGAAGG
AATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTATATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTG
GCAAATGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTT
TGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTC
CTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGGATTCCC
AATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCG
CTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCG
CATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGC
AGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCC
GCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGAC
GCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGAGTCCGCAAAAATCAC
CAGTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGAT
AAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTA
TTTGATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTGACCTGCA
GGCATGCAAGCTGATCCACTAGAGGCCATGGCGGCCGCGTCGAGCGATCTAGTAACATAGATGA
CACCGCGCGGATAATTTATCCTAGTTTTGCGCGCTATATTTGTTTTCTATCGCGTATTAATGTAT
AATTGCGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTA
CATGCTTAACGTAATTCACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCATC
TTAAGAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCGGGGAAATTCGAGTCGACTCTAGAGGATCCC
CGGCCGCCCGACTCTAGTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGG
CGGTACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGA
CTGGGTGCTCAGGTAGTGTGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCCCGATGGGGGTGTTCTG
CTGGTAGTGGTCCGCGAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGGTCTTGAAGTTCACC

TTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCGGTGATATAGACCTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTIONCAG
CTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCA
GGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTGCTCCTGAAGAAGAT
GGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG
TCGGGGTAGCGGGCGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAAGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGG
CACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCC
CTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTGCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATG
GGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCCACCATGGTGGCTTTACCAACAGTACCGG
AATGCCAAGCTTACTTAGATCGCAGATCTACTAGTATGATGGGTACCCGGGGGATCCGGATTTGT
ATTGACCACAGCTTGCTTGGCTTAAATGATGCGCTCTACTAATGAGAATGATGGATGAGGAAGGA
TGATCGTCATGCTATGGGGCTATTTATAGCTGCCATGGAATGATCTCTTTCACAATTGGCATTGT
TTGTGTGGAAAGTGCTTGGATGCTTCTAAAAATCATCATTTGGAATGTTCTGTTTGGTGGCACTAC
TTACAAGTGTATTCTTGGACTGGTCATTAAGTTCCTTGTGTTGCACTATCATTCCACCACCAAAA
AGGTGTGATAACATGCATGACTCATCTTATTCATTTACAGCTCAAACACTAATCTAGATTGCGTAT
TTTTCTGAAACTAAGTTTCTAATTTTTCTGCAAAATGTTACGCATAAACTAGATAAGTATGGCTGGCA
CGGTACTTAGTTTGAATCTTGTGTGGTCTGTTAAGATAGATAAGACTAGTAATGTAACCTTGCTTTA
GTAGGCCATGACTCGTCAAATTCCTTTACATGTCAAGTGTGTAGTGTCTAGAAGTTATTAGCA
AGCATAAATTTTGAATGTTCTACAAGTGTACGTGTAACTAGATAAGCTTGACTTGCACACAAA
CAAGATTGTAATCACTAGTCATCTACCCGTGCAACTGCACGGCCTAGCTATTATAGGGGTACATAT
TTATTAATAAATATTTATATGTAATAATTCAAGCGCTTAAATTACAGATATCATAACATCTGAACATATG
CTAAGTTATTCAAACAATTATAGTACAATATAAGCACATATATTATAAACTTCATTATATGGAAGAGT
GCCTCTACTTCCATTTATATAAAAAAATATGAACATCTCCAATACCAAGGCTATATAGTATGGAAA
TACATTTCTTACGCATCTGGTAATAATTATTTTCAATTGTGAATGTTGATATTTTTTTTATTATAAAG
TTAGTTAAAATTTACAAATCTTGACTTTGACCAAATTTATATGCAGACTAAAAATAAATGGAGGGA
GTATCTTGGGGTCTCTGCCACGTACGTTTCTCATAACATTCAGTACGCGTGTGCCCCGAACGAG
TGGAGACTGCATCGTCACCTTATCCTTTCCCTGCAGGCTCAAGTCTGCTTCTTCCAATCTTTTAT
TTCTAATCAAAGGCGAGTGAGGCGAGCTGGCCGGCAGCTCTTCGTGCGGGACGTCGTGCTCTA
CTTGCGCGCGCCAATGGCCAGCTCTCGTGGGATTACCCCTGTGCCCATGTACAACGGCCTTCC
AGAAGCCATCCGAGCGGCGGCCCCGCAACGCTCGCACGGAGGTCCCAACTTAGGAGGTGGACG
AGGACTAGTCCGATGATATCAGATCCACTAGTAAGGCCTTAAGGGCCAGATCTTGGGCCCGGTA
CCCGATCAGATTGTCGTTTTCCCGCCTTCGTTTTAACTATCAGTGTGTTGACAGGATATATTGGCG
GGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAAGGGCGTAAAAGGTTT
ATCCGTTCCGTCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGGTTCCCTCGGGAGTGCTTGGCATTCC
GTGCGATAATGACTTCTGTTCAACCACCCAAACGTCGGAAAGCCTGACGACGGAGCAGCATTCC
AAAAAGATCCCTTGGCTCGTCTGGGTGGCTAGAAGTTCGAGTGGGCTGCTGTGGCTTGATCCC
TCAACGCGGTGCGCGACGTAGCGCAGCGCCGAAAATCCTCGATCGCAAATCCGACGCTGTGCA
AAAGCGTGATCTGCTTGTGCTCTTTTCGGCCGACGTCTTGCCAGTCATCACGCGCCAAAGTTC
CGTCACAGGATGATCTGGCGCGAGTTGCTGGATCTCGCCTTCAATCCGGGTCTGTGGCGGGAAC
TCCACGAAAATATCCGAACGCAGCAAGATATCGCGGTGCATCTCGGTCTTGCCTGGGCAGTCGC
CGCCGACGCCGTTGATGTGGACGCCGAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATG
ACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACC
AGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGCA
GAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
GTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGA
ACGGGGGGTTCTGTCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTAC
AGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTT
ATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTT
TGCTCACATGTTCTTCTGCTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGATTACCGCCTTTGAGTGA
GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA
GAGCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCAC

TCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGA
CTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCT
GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTT
TCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGGGGTACGTCGAGGTCGATCCAACCCCTCCGCTG
CTATAGTGCAGTCGGCTTCTGACGTTCACTGCAGCCGCTTCTGAAAACGACATGTGCGACAAGT
CCTAAGTTACGCGACAGGCTGCCGCCCTGCCCTTTTCTGGCGTTTTCTTGTGCGGTGTTTTAGT
CGCATAAAGTAGAATACTTGCGACTAGAACCCGGAGACATTACGCCATGAACAAGAGCGCCGCCG
CTGGCCTGCTGGGCTATGCCCGCGTCAGCACCCGACGACCAGGACTTGACCAACCAACGGGCCG
AACTGCACGCGGCCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCCGAGAAGATCACCGGCACCAGGCGCGACC
GCCCCGAGCTGGCCAGGATGCTTGACCACCTACGCCCTGGCGACGTTGTGACAGTGACCAGGC
TAGACCGCCTGGCCCGCAGCACCCGCGACCTACTGGACATTGCCGAGCGCATCCAGGAGGCCG
GCGCGGGCCTGCGTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACCACGCCGGCCGGCCGCATG
GTGTTGACCGTGTTCCGCGCATTGCCGAGTTCGAGCGTTCCTAATCATCGACCGCACCCGGA
GCGGGCGCGAGGCCGCCAAGGCGCGAGGCGTGAAGTTTGGCCCCGCCCTACCCTACCCCG
GCACAGATCGCGCACGCCCGCGAGCTGATCGACCAGGAAGGCCGCACCGTGAAAGAGGCGGCT
GCACTGCTTGGCGTGCATCGCTCGACCCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAGCGAGGAAGTGACG
CCCACCGAGGCCAGGCGGCGCGGTGCCCTCCGTGAGGACGCATTGACCGAGGCCGACGCCCT
GGCGGCCCGCCGAGAATGAACGCCAAGAGGAACAAGCATGAAACCGCACCCAGGACGGCCAGGAC
GAACCGTTTTTTCATTACCGAAGAGATCGAGGCGGAGATGATCGCGGCCGGGTACGTGTTGAGC
CGCCCCGCGCACGTCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAATCCTGGCCGTTTTGTCTGATGCCAAGCT
CGCGGCCTGGCCGGCGAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGCGCCGCCGTCTAAAAGGTGATG
TGTATTTGAGTAAACAGCTTGCCTCATGCGGTGCTGCGTATATGATGCGATGAGTAAATAAAC
AAATACGCAAGGGGAACGCATGAAGTTATCGCTGTACTTAACCAGAAAGGCGGGTCAGGCAAG
ACGACCATCGCAACCCATCTAGCCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGTTCTGTTAGTCG
ATTCCGATCCCAGGGCAGTGCCCCGCGATTGGGCGGCCGTGCGGGAAGATCAACCGCTAACCG
TTGTGCGCATCGACCGCCCGACGATTGACCGCGACGTGAAGGCCATCGGCCGGCGCGACTTCG
TAGTGATCGACGGAGCGCCCCAGGCGGCGGACTTGGCTGTGTCCGCGATCAAGGCAGCCGACT
TCGTGCTGATTCCGGTGCAGCCAAGCCCTTACGACATATGGGCCACCGCCGACCTGGTGGAGCT
GGTTAAGCAGCGCATTGAGGTCACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTTGTCTGTGCGGGC
GATCAAAGGCACGCGCATCGGCGGTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGGTACGAGCTGCCCAT
TCTTGAGTCCCGTATCACGCAGCGCGTGAGCTACCCAGGCACTGCCGCCCGCCGGCACAACCGTT
CTTGAATCAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGCGAGGTCCAGGCGCTGGCCGCTGAAATTTAA
TCAAACCTCATTTGAGTTAATGAGGTAAAGAGAAAATGAGCAAAGCACAAACACGCTAAGTGCC
GGCCGTCCGAGCGCACGACGCAAGGCTGCAACGTTGGCCAGCCTGGCAGACACGCCAGC
CATGAAGCGGGTCAACTTTCACTTGCAGGCGGAGGATCACACCAAGCTGAAGATGTACGCGGTA
CGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGCGCAGCTACCAGAGTAAATGA
GCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGCGGCTAAAGGAGGCGGCATGGAAAATCAAGAACA
ACCAGGCACCGACGCCGTGGAATGCCCATGTGTGGAGGAACGGGCGGTTGGCCAGGCGTAAG
CGGCTGGGTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCAAGCCCGAGGAATCGGCGTG
AGCGGTGCAAACCATCCGGCCCGGTACAAATCGGCGCGGCGCTGGGTGATGACCTGGTGGAG
AAGTTGAAGGCGGCGCAGGCCGCCAGCGGCAACGCATCGAGGCAGAAGCACGCCCCGGTGA
ATCGTGGCAAGCGGCCGCTGATCGAATCCGCAAAGAATCCCGGCAACCGCCGGCAGCCGGTGC
GCCGTGATTAGGAAGCCGCCCAAGGGCGACGAGCAACCAGATTTTTTTCGTTCCGATGCTCTAT
GACGTGGGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCATGGACGTGGCCGTTTTCCGTCTGTGCAAGCGTG
ACCGACGAGCTGGCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCCAGACGGGCACGTAGAGTTTTCCGCGAG
GGCCGGCCGGCATGGCGAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACTGATGGCGTTTTCCCATCTAAC
CGAATCCATGAACCGATAACCGGAAGGGGAAGGGAGACAAGCCCGGCCGCGTGTCCGTCCACA
CGTTGCGGACGTACTIONAAGTTCTGCCGGCGAGCCGATGGCGGAAAGCAGAAAGACGACCTGGT
AGAAACCTGCATTCCGTTAAACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAAGGCCAAGAAC
GGCCCGCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGCCGCTACAAGATCGTAAAGAGCG
AAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGATTGGATGTACCGCGAGATCACAGA
AGGCAAGAACCCGGACGTGCTGACGGTTCACCCCGATTACTTTTTGATCGATCCCGGCATCGGC
CGTTTTCTTACCCTGGCACGCCGCGCCGAGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTGTTCAAGA
CGATCTACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCTGTTTACCCTGCGCAAGCT

GATCGGGTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTTGAAGGAGGAGGCGGGGCAGGCTGGCCCGAT
CCTAGTCATGCGCTACCGCAACCTGATCGAGGGCGAAGCATCCGCCGTTCCCTAATGTACGGAG
CAGATGCTAGGGCAAATTGCCCTAGCAGGGGAAAAAGGTCGAAAAGGTCTCTTTCTGTGGATA
GCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCCGGAACCCGTACATTGGGAACCCAAA
GCCGTACATTGGGAACCCGTCACACATGTAAGTGAAGTACTGATATAAAAAGAGAAAAAAGGCGATTTTT
CCGCCTAAAACCTTTTAAAACCTTATTA AAAACTCTTAAAACCCGCCTGGCCTGTGCATAACTGTCTG
GCCAGCGCACAGCCGAAGAGCTGCAAAAAGCGCCTACCCTTCGGTCGCTGCGCTCCCTACGCC
CCGCCGCTTCGCGTCGGCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCAAAAATGGCTGGCCTACGGCCAG
GCAATCTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGTCGCCACTCGACCGCCGGCGCCACATCAAG
GCACCCGGTGGGTATGCCTGACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCCGCCAGCCAGG
ACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAACCGGAT
GAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTCCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATG
CGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTT
TTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGC
GCGTTACGCCGTGGGTGCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGT
CGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATC
AGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGC
TCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAA
GGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAAACTTCGGCTTCCCCTGGA
GAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGC
GTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATC
TTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGT
TGCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAG
GCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGAACTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATG
TAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAATCGCGCCGAAGGATGT
CGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGA
CAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGT
CCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAACAATTCGTTCAAGCC
GACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTGCTCACAG
CCAAACTATCAGGTCAAGTCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGTGATAATAAGCCCTACACAAATTGG
GAGATATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTTGTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATA
GCTTGCTTGGTCGTTCCGCGTGAACGTCGGCTCGATTGTACCTGCGTTCAAATACTTTGCGATCG
TGTTGCGCGCCTGCCCGGTGCGTCGGCTGATCTCACGGATCGACTGCTTCTCTCGCAACGCCAT
CCGACGGATGATGTTTAAAAGTCCCATGTGGATCACTCCGTTGCCCGTTCGCTCACCGTGTTGG
GGGAAGGTGCACATGGCTCAGTTCTCAATGGAATTTATCTGCCTAACCGGCTCAGTTCTGCGTA
GAAACCAACATGCAAGCTCCACCGGGTGCAAAGCGGCAGCGGCGGCAGGATATATTCAATTGTA
AATGGCTTCATGTCCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGAAAA
AGAAAGAGTAATTACCAATTTTTTTTTCAATTCAAAATGTAGATGTCCGCAGCGTTATTATAAATG
AAAGTACATTTTGATAAAACGACAAATTACGATCCGTCGTATTTATAGGCCGAAAGCAATAAACA
TTATTCTAATTCGGAAATCTTTATTTTCGACGTGTCTACATTCACGTCCAAATGGGGGCTTAGATGA
GAACTTCACGATCGGC

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Doktorarbeit sind in die folgenden Tagungsbeiträgen eingegangen.

Tagungsbeiträge-Vorträge

Bruchmüller A., J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: RNA-directed RNA Polymerase RDR5 is essential for transcript level-mediated post-transcriptional gene silencing. - International Conference "Molecular Aspects of Plant Development", Wien, Österreich, 23.-26.02.2010.

Tagungsbeiträge-Poster

Bruchmüller, A., C. Marthe, G. Hensel, B. Sode, S. Goedeke, N. Borisjuk, R. Brodzik, H. Koprowski und J. Kumlehn: Expression of influenza A (H5N1) vaccine in barley grains for oral bird immunization. – 3rd Plant Science Student Conference, IPB, Halle/S., 05.-08.06.2007.

Bruchmüller, A., C. Marthe, G. Hensel, B. Sode, S. Goedeke, N. Borisjuk, R. Brodzik, H. Koprowski und J. Kumlehn: Expression of influenza A (H5N1) vaccine in barley grains for oral bird immunization. – Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie Workshop "Neue Impulse aus der Grundlagenforschung für angewandte Pflanzenbiotechnologie", RLP AgroScience, Neustadt/Weinstraße, 12.-13.07.2007.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, M. Gahrtz, C. Kaydamov, R. Schmidt, J. Kumlehn und M. F. Mette: Improvement of recombinant protein expression by modification of RNA silencing pathways in plants. . – Institutstag IPK, Gatersleben, 22.-23.10.2007

Bruchmüller, A., C. Marthe, G. Hensel, B. Sode, S. Goedeke, N. Borisjuk, R. Brodzik, H. Koprowski und J. Kumlehn: Expression of influenza A (H5N1) vaccine in barley grains for oral bird immunization. – Institutstag IPK, Gatersleben, 22.-23.10.2007.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of transcript level-dependent post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis thaliana. – 4th Plant Science Student Conference, Gatersleben, 01.-04.07.2008.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of transcript level-dependent post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis thaliana. - XX International Congress of Genetics, Berlin, 12.-17.07.2008.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of transcript level-dependent post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis thaliana. - 5th GBM-Meeting on RNA Biochemistry, Kassel, 18.-21.09.2008.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of transcript level-dependent post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis thaliana. -IBMP 20th anniversary colloquim Straßburg, 16.-17.10.2008.

Kuhlmann, M., A. Bruchmüller, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of RNA-directed transgene silencing in *Arabidopsis thaliana*. - Institutstag IPK, Gatersleben, 29.-30.09.2008.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Genetic analysis of transcript level-dependent post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. – 5th Plant Science Student Conference, IPB, Halle/S., 23.-26.06.2009.

Bruchmüller, A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: Reverse-genetic analysis of transcript level-dependent gene silencing. - Institutstag IPK, Gatersleben, 12.-13.10.2009.

Bruchmüller A., M. Kuhlmann, J. Kumlehn, R. Schmidt und M. F. Mette: RNA-directed RNA Polymerase RDR5 is Essential for Transcript Level-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing. - 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, 06.-10.06.2010.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und dadurch einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Florian Mette und Herrn Dr. Jochen Kumlehn bedanken für die Möglichkeit diese spannende Arbeit in ihren Arbeitsgruppen durchführen zu können. Die Betreuung der Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft waren ausschlaggebend für die Entstehung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. K. Pillen vom Institut für Pflanzenzüchtung danke ich für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit vonseiten der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

Herrn Prof. A. Graner und Frau PD R. Schmidt vom IPK Gatersleben danke ich für die Bereitschaft, ein Gutachten für diese Arbeit zu schreiben.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. M. Kuhlmann aus der AG „Epigenetik“ für die Bereitstellung der Bisulfit-Sequenzierungsdaten und die Hilfsbereitschaft während meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich Dr. Koichi Watanabe aus der AG „Karyotypevolution“ danken für die FISH-Untersuchungen meiner transgenen Gerstenlinien.

Besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern meiner beiden Arbeitsgruppen „Epigenetik“ und „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“, in der ich die vorliegende Arbeit angefertigt habe, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in den vergangenen vier Jahren. Mein spezieller Dank gilt: Carola Bollmann, Christa Fricke, Beate Kamm, Inge Glaser, Ingrid Otto, Andrea Müller, Conny Marthe und Dr. Götz Hensel.

Ganz besonders möchte ich bei meinen „Doktorandenkollegen“ Stefanie Goedeke, Christine Kastner, Jan Riechen und Andreas Finke für die abwechslungsreichen Gespräche neben der Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei den Gärtnern in den Gewächshäusern „Genetik“ und „Chemie“ und den Grafikern des IPKs.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie, meine Eltern (Gabriele und Otto) und meinen Ehemann Tobias für ihre Liebe und Unterstützung in der Zeit meiner Doktorarbeit.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Astrid Bruchmüller
Geburtstag	12.04.1981
Geburtsort	Quedlinburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1987 bis 1991	Fritz-Weineck-Oberschule Quedlinburg
1991 bis 1999	GutsMuths-Gymnasium Quedlinburg

Berufsausbildung

1999 bis 2001	staatlich geprüfte Landwirtschaftliche-technische Assistentin (LTA) an der Berufsbildenden Schule in Braunschweig und Fachpraktikum bei der Nordsaat Saatzuchtgesellschaft m.b.H. in Böhnshausen
---------------	--

Studium

2001 bis 2006	Studium der Agrarwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Fachrichtung im Hauptstudium: Pflanzenwissenschaften Diplomarbeit am damaligen Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz mit dem Thema; „Untersuchungen zur Genetik und Übertragung von Flugbrandresistenz bei Nackthafer.“ Abschluss: Dipl.-Ing. agr.
---------------	--

Berufstätigkeit

2006 bis 2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abt. Physiologie und Zellbiologie sowie Cytogenetik und Genomanalyse, Arbeitsgruppen Pflanzliche Reproduktionsbiologie und Epigenetik, Gatersleben
---------------	---

Seit 01.04.2010

Wissenschaftliche Angestellte am Julius-Kühn-Institut (JKI),
Institut Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Quedlinburg

Quedlinburg, Juli 2010

Astrid Bruchmüller

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Quedlinburg, Juli 2010

Astrid Bruchmüller

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: “ Untersuchungen zur post-transkriptionellen Gen-Inaktivierung in (monokotylen und dikotylen) Pflanzen und deren Beeinflussung zur Erhöhung der Transgen-Expression” selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Quedlinburg, Juli 2010

Astrid Bruchmüller