

**Untersuchungen zur Geninaktivierung innerhalb einer
Generationsanalyse
transgener homozygoter *Vicia narbonensis*-Linien**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin
(Institut für Angewandte Genetik)

vorgelegt von
Sabine Brinkmann
aus Oldenburg i/O

Berlin 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Kreß
2. Gutachterin: Prof. Dr. M.-D. Sacristan

Datum der Disputation: 3. Februar 2003

Abstract

Insertion of foreign DNA into plant genomes frequently results in the identification of transgenic plants with silenced transgenes. This stable but potentially reversible loss of gene activity resembles epigenetic changes. In most studies of genetically transformed plants, transgene inactivation has been correlated with multiple (complete or incomplete) copies of the transgene. The expression of single-copy transgene loci may also be negatively influenced, e.g. by chromosomal location. In order to study the presence and the inheritance of genes introduced into the grain legume *Vicia narbonensis*, the progeny of two independent homozygous transgenic lines that were obtained by transformation with *Agrobacterium*-strain C58Cl carrying the plasmid pGV3850Hygro was analysed. This cointegrate vector contains the coding sequence for the hygromycin-phosphotransferase gene (HPT-gene) driven by the CaMV 35S promoter, and the nopaline-synthase gene (NOS-gene) driven by the nos-promoter. Initial transformants harbouring a single copy integration of the T-DNA and the progeny of two such clones was analysed in detail. The transgenes were inherited in the first generation according to Mendelian laws. During self-pollination processes, homozygous sublines were obtained and further characterised. In order to follow the transmission of the two foreign genes for a long period, biochemical and molecular analyses were performed up to the seventh generation. To examine the influence of environmental effects, plants were grown up in glasshouses with and without air-condition (high temperature stress). Methylation-analyses at the 35S promoter and the HPT-gene of plants with silenced HPT-gene which were raised in air-conditioned glasshouses showed hypermethylation within the 35S promoter sequence. Surprisingly, no correlation was found between hypermethylation within the promoter region and gene silencing in plants grown up under high temperature stress in non-airconditioned glasshouses. All these plants regardless whether the HPT-gene was inactivated or not showed hypermethylation at the 35S promoter and the analysed HPT sequence. This results indicates that DNA methylation alone is not required for gene inactivation.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 „Gene silencing“-Effekt in höheren Pflanzen	1
1.2 „Transcriptional gene silencing“ (TGS)	3
1.3 „Post-transcriptional gene silencing“ (PTGS)	7
1.4 DNA-Methylierungen	8
1.5 Methyltransferasen in Pflanzen	11
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Pflanzenmaterial	15
2.1.1 Samenkeimung und Kulturbedingungen	16
2.1.2 Gewächshausbedingungen	16
2.2 Untersuchungen auf Mutationen innerhalb des 35S-Promotors, des HPT-Gens, des NOS-Promotors und des NOS-Gens	16
2.3 Nachweis der Hygromycinresistenz und der Nopalinproduktion transgener <i>Vicia narbonensis</i> -Nachkommen nach Selbstungsexperimenten gemäß den Mendelschen Erbgängen	18
2.3.1 Test auf Hygromycinresistenz	18
2.3.2 Nachweis der Nopalinsynthese-Aktivität	18
2.4 Southern Blot-Analysen von Nachkommen der beiden Initialtransformanten 4.1 und 9.1	19
2.4.1 DNA-Isolation	19
2.4.2 Southern Blot-Analysen	19
2.5 Analysen zum Methylierungsstatus	19
2.5.1 Bisulfit-Modifikation der DNA	19

	Seite	
2.5.2	Durchgeführte Kontrollen zur Gewährleistung einer vollständigen Bisulfit-Modifikation der DNA	20
2.5.2.1	Kontrolle der Bisulfit-Modifikation mit Hilfe von Plasmid-DNA	20
2.5.2.2	Kontrolle der Bisulfit-Modifikation innerhalb einer bekannten Gensequenz aus dem Genom von <i>Vicia narbonensis</i>	22
2.5.3	Untersuchungen zum Methylierungsgrad der Transgene einzelner homozygoter Nachkommen der beiden transgenen <i>Vicia narbonensis</i> -Linien	23
2.6	Northern Blot-Analysen homozygoter Nachkommen beider transgener <i>Vicia narbonensis</i> -Linien	24
2.6.1	RNA-Isolation und Northern Blot	24
3.	Ergebnisse	26
3.1	Untersuchungen auf Mutationen innerhalb der beiden Transgene	26
3.2	Nachweis der Hygromycinresistenz und der Nopalinsyntheseaktivität transgener <i>Vicia narbonensis</i> -Nachkommen nach Selbstungsexperimenten gemäß den Mendelschen Erbgängen	26
3.2.1	Test auf Hygromycinresistenz	26
3.2.2	Nachweis der Nopalinsyntheseaktivität	29
3.3	Analysen zur Kosegregation der Expression des HPT-Gens und des NOS-Gens in den Nachkommen der Linien 4.1 und 9.1 von <i>Vicia narbonensis</i>	31
3.3.1	Dokumentation der Kosegregation der Expression beider Transgene	31
3.3.2	Chi-Quadrat-Test	39

	Seite	
3.4	Southern Blot-Analysen von Nachkommen der beiden Initialtransformanten der Linien 4.1 und 9.1	39
3.5	Analysen zum Methylierungsstatus	41
3.5.1	Kontrollen zur Bisulfit-Modifikation	41
3.5.1.1	Kontrolle der Bisulfit-Modifikation mit Hilfe von Plasmid-DNA	41
3.5.1.2	Kontrolle der Bisulfit-Modifikation innerhalb einer bekannten Gensequenz aus dem Genom von <i>Vicia narbonensis</i>	42
3.5.1.3	Klimabedingungen in den nicht klimatisierten Gewächshäusern	43
3.5.2	Amplifikation der integrierten Fremdgene Bisulfit-modifizierter DNA von homozygoten Nachkommen der beiden transgenen <i>Vicia narbonensis</i> -Linien	48
3.5.3	Untersuchungen zum Methylierungsgrad der beiden Transgene homozygoter Nachkommen von <i>Vicia narbonensis</i> , welche unter <u>klimatisierten</u> Gewächshausbedingungen wuchsen	50
3.5.3.1	Untersuchungen zum Methylierungsgrad des NOS-Promotors und der 200bp-Sequenz des 5'-Endes des NOS-Gens	50
3.5.3.2	Untersuchungen zum Methylierungsgrad des 35S-Promotors und der 224bp-Sequenz des 5'-Endes des HPT-Gens einzelner homozygoter Nachkommen der beiden transgenen <i>Vicia narbonensis</i> -Linien	55
3.5.3.3	Northern Blot-Analysen homozygoter Nachkommen beider transgener <i>Vicia narbonensis</i> -Linien	59

	Seite	
3.5.4	Untersuchungen zum Methylierungsgrad der beiden Transgene homozygoter Nachkommen von <i>Vicia narbonensis</i> , welche unter <u>nicht klimatisierten</u> Gewächshausbedingungen wuchsen	62
3.5.4.1	Untersuchungen zum Methylierungsgrad des NOS-Promotors und der 200bp-Sequenz des 5'-Endes des NOS-Gens	62
3.5.4.2	Untersuchungen zum Methylierungsgrad des 35S-Promotors und der 224bp-Sequenz des 5'-Endes des HPT-Gens	68
4.	Diskussion	76
4.1	„Gene silencing“ und Methylierungsstatus von Pflanzen unter <u>klimatisierten</u> Gewächshausbedingungen	76
4.1.1	Einfluß repetitiver DNA-Sequenzen	78
4.1.2	Zeitpunkt der Geninaktivierung	80
4.2	„Gene silencing“ und Methylierungsstatus von Pflanzen unter <u>nicht klimatisierten</u> Gewächshausbedingungen	82
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	84
5.	Anhang	
A1	Tabellen 19 und 20 – Methylierungsmuster der analysierten Sequenzen des NOS-Promotors und des NOS-Gens transgener <i>Vicia narbonensis</i>	86
A2	Tabellen 21 und 22 – Methylierungsmuster der analysierten Sequenzen des 35S-Promotors und des HPT-Gens transgener <i>Vicia narbonensis</i>	89
6.	Literatur	93

		Seite
7.	Verzeichnisse	104
7.1	Tabellenverzeichnis	104
7.2	Abbildungsverzeichnis	107
7.3	Abkürzungen	109