

1. Einleitung

1.1 „Gene silencing“-Effekt in höheren Pflanzen

Die Transformation von Pflanzen ist bereits gängige Praxis in der modernen Biotechnologie und Molekularbiologie. Ziel der Transformationen ist es, Pflanzen herzustellen, die wegen ihres veränderten Genoms neue Eigenschaften wie z.B. Krankheits-, Insekten-, Virus- oder Herbizidresistenz besitzen oder Pflanzen zu regenerieren, deren Inhaltsstoffe verändert wurden oder die neue Inhaltsstoffe produzieren. Für eine wachsende Anzahl bedeutender Kulturpflanzen ist es bereits möglich, agronomisch und ökonomisch interessante Eigenschaften durch das Einbringen von Fremdgenen zu verändern. Vom kommerziellen Standpunkt aus gesehen eignen sich Pflanzen besonders als Bioreaktoren zur Massenproduktion von Proteinen für therapeutische und industrielle Anwendungen. Pflanzen besitzen ein hohes Speicherpotential, können eine beträchtliche Biomasse erzeugen und sind leicht anzubauen. Der Einsatz von Pflanzen als Bioreaktoren ist im Vergleich zu den kostenintensiven Bioreaktoren für genetisch veränderte Bakterien, die eine teure Ausrüstung, hohe Laborkosten und gut geschultes Personal benötigen, besonders kosteneffektiv (De Wilde *et al.* 2000). Agronomisch und ökonomisch bedeutend sind transgene Pflanzen jedoch nur, wenn die gewünschten Eigenschaften während der gesamten Entwicklung der Pflanzen stabil bleiben, nach den Mendelschen Vererbungsregeln an die nachfolgenden Generationen weitervererbt und dort auch stabil exprimiert werden. Instabilitäten im Expressionslevel der Transgene und darüber hinaus auch endogener Gene behindern generell die Verwendung von Pflanzen als Produktionssystem für heterologe Proteine (De Neve *et al.* 1999, De Wilde *et al.* 2000).

Nach stabiler Integration von Transgenen kommt es häufig zu Veränderungen in der Expression der Transgene bis hin zur vollständigen Geninaktivierung. Diesem als „gene silencing“ bezeichneten Phänomen kommt eine besondere Bedeutung zu, weil die Inaktivierung der Transgene möglicherweise den gleichen regulatorischen Mechanismen unterliegt, welche die Genexpression endogener Gene steuern. So können z.B. endogene Gene durch die Einbringung fremder Gene in das Genom teilweise oder vollständig inaktiviert werden, wenn die Transgene eine ausreichende Homologie zu dem entsprechenden endogenen Gen besitzen. Bei einigen Experimenten, in denen die Expression endogener Gene durch das zusätzliche Einbringen einer weiteren Kopie dieses Gens erhöht werden sollte, kam es nicht zu einer Erhöhung der Expression, sondern zu einer starken Reduzierung bis hin zu keiner detektierbaren Expression sowohl des endogenen Gens als auch des zusätzlich eingebrachten Gens (Napoli *et al.* 1990, van der Krol 1990, Baulcombe

und English 1996, English *et al.* 1996, Depicker und van Montagu 1997). Diese Form des „gene silencing“ wurde als Ko-Suppression bezeichnet. Das Phänomen des „gene silencing“ beruht darauf, daß es zu keiner oder einer nur sehr schwachen Transkription der Gene kommt, oder aber RNA wird produziert, führt aber nicht zur anschließenden Translation des entsprechenden Proteins (siehe hierzu Punkt 1.2 und 1.3).

Bei der Integration von Transgenen ins Genom können in der Sequenz der Fremd-DNA Punktmutationen, Deletionen und Sequenzumlagerungen auftreten. Oft vereinigen sich mehrere Kopien der Fremdgene zu langen Strängen, die als Ganzes ins Genom integriert werden (Jongsma *et al.* 1987). Verschiedene Studien über die Expression von Transgenen weisen auf eine Korrelation zwischen der Expression und der Anzahl der integrierten Kopien hin. Wenn in einem Genom viele transgene DNA-Kopien als „Cluster“ oder verstreut integriert waren, zeigten die inserierten Gene eine geringere Expression als im Falle einer oder weniger Kopien (Jones *et al.* 1987, Deroles und Gardner 1988 a/b, Selker und Garret 1988, Flavell 1994, Atkinson *et al.* 1998) unabhängig, ob sie als direkte, indirekte oder als invertierte Sequenzwiederholungen ins Genom integriert wurden. Häufig sind multiple transgene Kopien ein Ziel für *de novo* Methylierungen (Hobbs *et al.* 1990, Assad *et al.* 1993, Matzke *et al.* 1994, Baulcombe und English 1996). Diese Beobachtung ist analog zu den in Pilzen beobachteten Phänomenen wie „repeat-induced point mutation“ (RIP) in *Neurospora crassa* (Cambareri *et al.* 1989, Matzke und Matzke 1998) und „methylation induced premeiotically processes“ (MIP) in *Ascobolus immersus* (Rhounim *et al.* 1992 und 1994). *N. crassa* neutralisiert potentiell rekombinante DNA-Sequenzwiederholungen mit Hilfe von RIP. In jeder weiteren Kopie eines Gens im prämeiotischen haploiden Nukleus finden Basenmutationen statt. Die Mutationen beruhen auf den Austausch von CG-Basenpaaren durch AT-Basenpaare. Diese Transitionen können 10% bis 30% der CG-Basenpaare einer Sequenz betreffen (Cambareri *et al.* 1989). Nicht mutierte Cytosine werden methyliert. Möglich ist, daß durch die Mutationen abweichende DNA-Strukturen entstehen, die direkt oder indirekt Einfluß auf die Aktivität von Methyltransferasen (Mtsen) nehmen (Singer *et al.* 1995, Matzke und Matzke 1998a). Im Gegensatz dazu treten bei *A. immersus* in den Sequenzwiederholungen keine Mutationen auf. Sequenzduplikate wurden während der sexuellen Phase methyliert und inaktiviert. Diese Geninaktivierungen sind reversibel. Ein vorher methyliertes und inaktives Gen wurde normal exprimiert, nachdem es in *E. coli* amplifiziert und anschließend wieder in *A. immersus* eingebracht wurde. Das Phänomen des „gene silencing“ und das Methylierungsmuster wurden sowohl durch vegetative als auch durch sexuelle Reproduktion an die Nachkommen vererbt (Rhounim *et al.* 1992).

In vielen Fällen scheint „gene silencing“ homologieabhängig zu sein, jedoch wurden Geninaktivierungen auch bei Integrationen von einzelnen Genkopien beobachtet (Elmayan und Vaucheret 1996, Fu *et al.* 2000). In homozygoten Pflanzen können Interaktionen zwischen den Allelen in der Art wie die erstmals von Brink (1956) beobachteten Paramutationen für einen Genort bei Mais zur Geninaktivierung beitragen (Meyer *et al.* 1993, Matzke *et al.* 1996). So kann ein paramutagenes, transkriptionell inaktives Allel mit Hypermethylierungen im Promotorbereich diesen inaktiven Zustand auf ein zweites vorher aktives und hypomethyliertes Allel übertragen. Während der Meiose bleibt dieser inaktive Zustand erhalten und wird stabil weitervererbt (Meyer *et al.* 1993). Bollmann *et al.* (1991) beobachteten bei *Antirrhinum* jedoch auch die Reaktivierung von paramutagenen Allelen.

Auch die chromosomale Umgebung des Integrationsortes eines Transgens kann einen Einfluß auf die Genexpression ausüben. Ein Fremdgen kann inaktiviert werden, wenn es in einem stark methylierten oder repetitiven Locus integriert wird. Diese Beobachtung deutet daraufhin, daß das integrierte Fremdgen von den Eigenschaften der flankierenden DNA-Sequenzen abhängig ist (Pröls und Meyer 1992). Jedoch kann ein Transgen, welches in hypomethylierte DNA integriert wurde, ebenfalls transkriptionell inaktiviert werden (Pröls und Meyer 1992, Meyer *et al.* 1993, Meyer und Heidmann 1994). Diese *de novo* Methylierungen der Transgene könnten eine zelluläre Schutzreaktion gegen potentiell schädigende Aktivität dieser fremden DNA sein (Dörfler 1995).

1.2 „Transcriptional gene silencing“ (TGS)

Generell wird zwischen zwei Mechanismen des „gene silencing“-Effekts unterschieden, dem „transcriptional gene silencing“ (TGS) und dem „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS). Der Mechanismus, der zum TGS führt, ist häufig korreliert mit Hypermethylierungen im Promotorbereich und/oder Änderungen in der Chromatinstruktur mit einer daraus resultierenden starken Reduktion bzw. keiner Transkription des Strukturgens. Aus vielen Studien geht hervor, daß TGS in der Regel mit der Integration von mehr als einer transgenen Kopie (Assaad *et al.* 1993, Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Furner *et al.* 1998) und damit einhergehenden Hypermethylierungen im Promotorbereich des transgenen Locus assoziiert ist (s. Abb.1). Diese Form des TGS wird in der Regel stabil an die Nachkommen weitervererbt (Park *et al.* 1996, Morino *et al.* 1999). Die Integration der Transgene kann sowohl in „cis“- als auch in „trans“-Orientierung erfolgen. In „cis“-Orientierung befinden sich zwei oder mehrere Kopien des Transgens im gleichen Locus, während sich in „trans“-Orientierung die Kopien der Fremdgene in unterschiedlichen Loci innerhalb des Genoms befinden.

Bei dem TGS verursacht durch eine Integration in „cis“-Orientierung könnte es während der Integration von mehreren Genkopien in einer Tandem-Anordnung zu einer Paarung von homologen Sequenzabschnitten kommen. Eine daraus resultierende Änderung in der Sekundärstruktur des Chromatins z.B. in der Form von Heterochromatin und damit einhergehenden Hypermethylierungen des Lokus könnten Ursache einer „cis“-Inaktivierung sein (Vaucheret und Fagard 2001) (s. Abb. 1). Jedoch kann auch eine einzelne Kopie eines Transgens transkriptionell inaktiviert werden (Meyer *et al.* 1993, Fu *et al.* 2000). Hierbei kann es zu Interaktionen zwischen den Allelen in der Form von Paramutation kommen (Meyer *et al.* 1993, Matzke *et al.* 1994). Fu *et al.* (2000) beobachteten ein anderes Phänomen des TGS nach der Integration von einer T-DNA Kopie in Reis. Ein Hygromycin-phosphotransferasegen (HPT-Gen) mit vorgeschaltetem CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S-Promotor wurde transkriptionell inaktiviert, ohne daß in einer homozygoten transgenen Pflanze Methylierungen im Promotorbereich detektiert wurden. Jedoch fanden sich Methylierungen an nicht konventionellen Orten in der kodierenden Region des Transgens. In dieser inaktivierten R1 Pflanze wurden alle methylierten Cytosinreste auf dem „sense“ Strang gefunden. Dies könnte auch erklären, warum die eine Hälfte der Nachkommen in der zweiten und dritten Generation den inaktiven Zustand des HPT-Gens erbten, während die andere Hälfte das Gen exprimierte (siehe Punkt 1.4). Dagegen zeigte eine andere homozygote transkriptionell inaktive Reispflanze Hypermethylierungen von Cytosinresten sowohl im Promotor als auch in der kodierenden Region des HPT-Gens. Diese R1-Pflanze vererbte den inaktiven Zustand des Resistenzgens an alle Nachkommen stabil weiter (Fu *et al.* 2000).

Eine „trans“-Inaktivierung von Transgenen kann durch die Integration der Fremdgene in unterschiedliche Loci innerhalb des Genoms hervorgerufen werden. Ein in Tabakpflanzen transkriptionell aktiver T-DNA Locus konnte nach wiederholter Transformation der transgenen Pflanzen mit einer weiteren T-DNA transkriptionell inaktiviert werden (Matzke *et al.* 1989). Die beiden verwendeten T-DNAs (T-DNA-I und T-DNA-II) enthielten sowohl unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene als auch unterschiedliche Synthasegene. In jeder T-DNA befanden sich Sequenzen von zwei Nopalinsynthasepromotoren (~300 bp). Hinzu kamen homologe Regionen in der Größe von ~2 kb und 1 kb neben der linken und rechten Bordersequenz. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß diese homologen Sequenzbereiche für die Methylierungen innerhalb der T-DNA-I in einigen der doppelt transformierten Pflanzen verantwortlich sind. Jedoch scheint auch der primäre Methylierungsgrad der Transgene einen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber „trans“-Inaktivierungen zu haben. Neuhuber *et al.* (1994) zeigten, daß partiell methylierte Transgene sensitiver reagierten als unmethylierte Loci mit dem gleichen Konstrukt. Für den „gene silencing“-Effekt ist zusätzlich die chromosomale Lokalisation der beiden T-DNAs zueinander

für etwaige Interaktionen von großer Bedeutung. Der T-DNA-II Locus war in allen doppelt transformierten Pflanzen unterschiedlich, entsprechend variierte auch der „gene silencing“-Effekt oder trat gar nicht auf. In Rückkreuzungsexperimenten konnte nach Segregation der beiden T-DNAs eine Abnahme der Methylierungen in der Promotorregion und parallel dazu eine Zunahme der Expression der Transgene beobachtet werden. Eine komplette Reaktivierung der Transgene erfolgte jedoch erst nach einigen Generationen (Matzke und Matzke 1990, 1991).

Die Möglichkeit, daß RNA-DNA Interaktionen Methylierungen der Gene bewirken könnten, wurde zuerst von Wassenegger *et al.* (1994) beschrieben. In Tabakpflanzen, welche mehrere cDNA-Kopien eines Kartoffelvirus im Genom integriert hatten, konnten *de novo*-Methylierungen der cDNAs während der Replikation des Virusgenoms detektiert werden. Die replizierte Virus-RNA löste direkt Methylierungen der cDNA-Kopien aus.

Um zu testen, ob TGS und Methylierungen von Promotorsequenzen in einer Ziel-DNA durch Promotor-RNA ausgelöst werden kann, wurde ein Genkonstrukt hergestellt, in dem ein 35S-Promotor zur Regulation der Transkription, einer NOS-Promotorsequenz vorgeschaltet wurde. Mit diesem Konstrukt wurden Pflanzen transformiert, die ein aktives NPT-II Gen, welches von einem NOS-Promotor reguliert wurde, enthielten. In einer Tabaklinie war eine nicht-polyadenylierte NOS-Promotor RNA fähig Methylierungen und Inaktivierung homologer NOS-Promotorsequenzen zu bewirken (Mette *et al.* 1999). Diese abweichende Promotor RNA war das Resultat von zwei invertierten Sequenzwiederholungen des NOS-Promotors im Integrationsloкус. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Sequenzwiederholungen zur Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen führen. Hier ließen sich dann Parallelen zu Virussystemen herleiten, in denen das Virusgenom aus doppelsträngiger RNA besteht und/oder während der Replikation gebildet wird (Mette *et al.* 1999).

Mit Hilfe von Einzelstrang spezifischen RNasen wurde dargelegt, daß die NOS-Promotor RNA der transgenen Pflanzen, welche die invertierten Sequenzwiederholungen des NOS-Promotors ins Genom integriert hatten, in der Tat doppelsträngig war und Methylierungen als auch transkriptionelle Inaktivierungen homologer Promotoren in „trans“-Orientierung bewirkte (Mette *et al.* 2000). Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, daß separate „sense“ und „antisense“ Transkripte des NOS-Promotors keine Inaktivierungen der homologen „Ziel“-Sequenzen hervorriefen.

Bisher ist jedoch unklar, wie durch die Gegenwart doppelsträngiger NOS-Promotor RNA Methylierungen und Inaktivierungen homologer Promotorsequenzen in der Ziel-DNA verursacht werden. Eine denkbare Möglichkeit wäre, direkte RNA-DNA Interaktionen

zwischen homologen Sequenzen (s. Abb. 1). Andererseits könnten jedoch auch kleinere RNA-Moleküle, die bei der Degradation von doppelsträngiger RNA entstehen, Methylierungen in homologen DNA-Sequenzen bewirken (Pelissier und Wassenegger 2000).

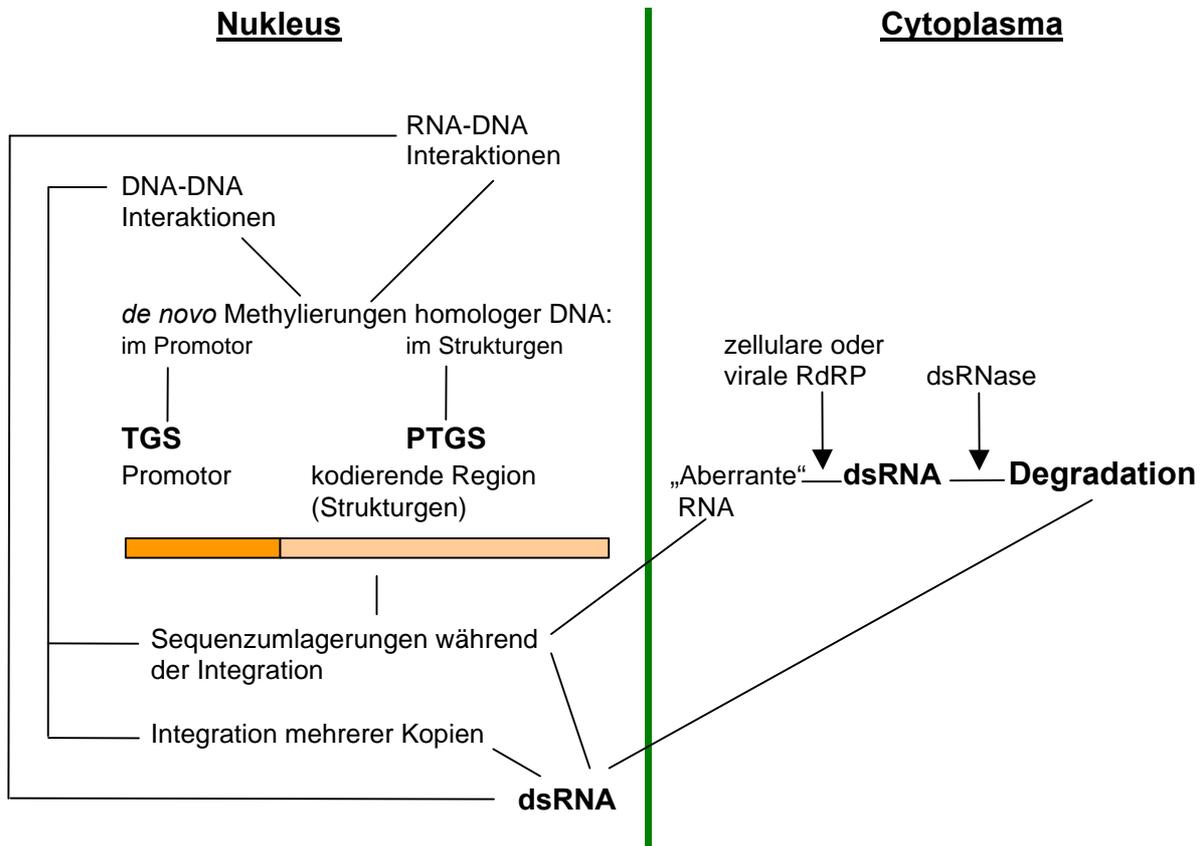


Abb. 1 Schematische Darstellung von zellulären Interaktionen, die zu einem „gene silencing“-Effekt führen können.

TGS (transcriptional gene silencing); PTGS (post-transcriptional gene silencing); dsRNA (doppelsträngige RNA); dsRNase (Doppelstrang spezifische RNase); RdRP (RNA-directed RNA polymerase);

Sequenzumlagerungen während der Integration und/oder die Integration von mehreren transgenen Kopien könnten durch Interaktionen zwischen homologen DNA-Sequenzen eine Änderung in der Chromatinstruktur und *de novo* Methylierungen homologer DNA bewirken und damit TGS oder PTGS verursachen. Auch können Sequenzwiederholungen zur Bildung von doppelsträngiger RNA führen. Hier könnten RNA-DNA Interaktionen zwischen homologen Sequenzen TGS oder PTGS bewirken. Andererseits kann es bei gleichzeitigem Auftreten von „sense“ und „antisense“ RNA und/oder aberranter RNA zur Bildung von dsRNAs kommen, welche dann von dsRNasen im Cytoplasma abgebaut werden.

1.3 „Post-transcriptional gene silencing“ (PTGS)

Bei dem „gene silencing“-Effekt auf post-transkriptioneller Ebene wird zwar RNA im ausreichenden Maße transkribiert, führt aber dennoch nicht zu dem Genprodukt. In vielen Fällen des PTGS wurden *de novo* Methylierungen in der kodierenden Sequenz der Transgene beobachtet (Hobbs *et al.* 1993, Ingelbrecht *et al.* 1994, English *et al.* 1996, van Houdt *et al.* 1997) (s. Abb. 1). Im Gegensatz zum transkriptionellen „gene-silencing“, bei welchem die Methylierungen und der inaktive Zustand der ausgeschalteten Gene sowohl klonal als auch über die Meiose vererbbar sind, sind in der Regel die beobachteten Methylierungen während des PTGS in der Meiose reversibel (Stam *et al.* 1997, Depicker *et al.* 1997). Welche Rolle diesen Methylierungen bei den Mechanismen des PTGS zukommt ist noch weitgehend ungeklärt.

Zur Erklärung des PTGS-Effekts wurden viele attraktive Modelle entwickelt. So z.B. das „threshold-“ oder „biochemical switch model“, welches auf den Effekt einer Überexpression von Transgenen beruht. Nach diesem Modell erreicht die Expression der inaktivierten Transgene einen zu hohen und dadurch kritischen Level. Als Folge davon werden Mechanismen ausgelöst, durch welche homologe RNAs unabhängig von ihrer Quelle abgebaut werden. Dieses Modell stützt sich auf Beobachtungen, in denen PTGS mit stark exprimierten Transgenen korreliert, und Virusresistenzen durch nicht translatierbare „sense“-RNAs vermittelt werden (Smith *et al.* 1994, 1995, Meins und Kunz 1994, Goodwin *et al.* 1996).

Ein anderes Modell beruht auf Beobachtungen, die bei gleichzeitigem Auftreten von „sense“ und „antisense“ RNAs gemacht wurden. Diese komplementären RNA-Stränge können sich zu doppelsträngigen Hybriden verbinden, welche dann von Doppelstrang spezifischen RNasen (dsRNasen) abgebaut werden (s. Abb. 1). Die Produktion von „antisense“-RNA könnte z.B. durch einen endogenen Promotor am 3'-Ende des Transgens oder durch aberrante RNAs, d.h. kürzere oder seltener längere RNAs induziert werden (Meyer 1995). Oft wurden bei PTGS aberrante RNAs beobachtet, während der Level vollständiger m-RNAs des betreffenden Gens stark reduziert war. Diese aberranten RNAs können durch Sequenzumlagerungen, vorzeitigen Transkriptionsabbruch oder durch Störungen während des „RNA-Processing“ der primären RNA verursacht werden (Depicker *et al.* 1997, Metzloff *et al.* 1997, Eldik *et al.* 1998).

Kurze homologe Regionen in der kodierenden Region von Transgenen reichen bereits aus um PTGS auszulösen. Insbesondere invertierte Sequenzwiederholungen in Konstrukten von

Transgenen sind starke Auslöser von PTGS, weil sie die Fähigkeit besitzen Sekundärstrukturen auf der DNA-Ebene und/oder RNA-Ebene auszubilden (Muskens *et al.* 2000).

Generell wird der Verlust des Genproduktes auf einen RNA-Degradationsprozeß im Cytoplasma zurückgeführt (Kooter *et al.* 1999, Wassenegger 2000, Matzke *et al.* 2001). Eine besondere Bedeutung hat in diesem Zusammenhang doppelsträngige RNA (dsRNA), da diese Moleküle mehrere Funktionen nebeneinander ausführen können. Einerseits besitzen sie die Fähigkeit *de novo* Methylierungen homologer DNA-Sequenzen im Nukleus zu beeinflussen (Mette *et al.* 1999, Wassenegger *et al.* 1994, Wassenegger 2000), andererseits induzieren sie einen sequenzspezifischen Degradationsprozeß, der zum PTGS führt (Fire 1999, Kooter *et al.* 1999, Waterhouse *et al.* 1999). Durch sequenzspezifische dsRNA induziertes PTGS wird als RNA-Interference (RNAi) bezeichnet. Es ist eine Methode der RNAi entwickelt worden, mit der einzelne Gene in Zellkulturen von Säugern gezielt inaktiviert bzw. ausgeschaltet werden können (Elbashir *et al.* 2001a). Für das gezielte Ausschalten einzelner Gene wurden kleine zur „target“-DNA homologe dsRNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden (siRNA, „small interfering RNA“) verwendet. Diese kleinen iRNAs zeigten sich bereits sehr effizient bei einer sequenzspezifischen Degradation von mRNA in Lysaten von *Drosophila*-Embryonen (Elbashir *et al.* 2001b). Unter natürlichen Umständen scheint die doppelte Funktion von RNAi ein Schutzmechanismus gegen fremde RNAs, welche z.B. bei einer Virusinfektion auftreten oder durch Transposons verursacht werden können, zu sein (Ratcliff *et al.* 1999, Plasterk und Ketting 2000).

1.4 DNA-Methylierungen

Oft ist die Geninaktivierung assoziiert mit Methylierungen. Dennoch ist bisher weitgehend unklar, welche Rolle den Methylierungen bei den beobachteten Mechanismen der Geninaktivierungen von Fremdgenen zukommt. Nichts ist darüber bekannt, was für Prozesse in dem Zeitraum während und kurz nach der Integration von Fremdgenen ins Genom ablaufen. Noch ist die Frage offen, ob Methylierungen die Ursache für das Phänomen des „gene silencing“ sind, indem sie z.B. die Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und regulatorischen DNA-Elementen verhindern, oder ob sie als Folge eines anderen primären Mechanismus wie z.B. durch eine Änderung in der Chromatinstruktur ausgelöst werden (Meyer *et al.* 1994, Park *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997, van Houdt *et al.* 1997, Kass *et al.* 1997).

Drei Arten von methylierten Basen kommen in ungeschädigter genomischer DNA lebender Organismen vor: N^4 -Methylcytosin (m4C), 5-Methylcytosin (m5C) und N^6 -Methyladenin (m6A) (Butkus *et al.* 1985, Vilkaitis und Klimasauskas 1999). Die Methylierungen sind das Resultat einer postreplikativen, enzymatischen Modifikation der DNA mit Hilfe von spezifischen DNA-MTasen. In den Genomen von höheren Eukaryonten wurden bisher fast ausschließlich m5C-Methylierungen identifiziert. In seltenen Fällen fand man vereinzelt m6A (Müller *et al.* 1990). Die in Prokaryonten vorhandenen DNA-Methylierungen sind einerseits Bestandteil des Restriktions-Modifikationssystems, mit dessen Hilfe eigene von fremder DNA unterschieden wird, andererseits haben sie eine biologische Funktion bei der Replikation und der DNA-Reparatur (Messer und Noyer-Weidner 1988). Dagegen sind in Eukaryonten DNA-Methylierungen in mehrere verschiedene zelluläre Prozesse verwickelt, wie bei der Replikation (Delgado *et al.* 1998, Antequera und Bird 1999, Knox *et al.* 2000), der Embryonalentwicklung bei Vertebraten (Monk *et al.* 1987, Li *et al.* 1992), der Genregulation während der Entwicklung z.B. bei *Arabidopsis thaliana* (Finnegan *et al.* 1996), dem „Imprinting“, d.h. die Prägung von Genen zwischen den Generationen (Feil und Khosla 1999), der X-Chromosomeninaktivierung in weiblichen Säugerzellen (Goto und Monk 1998), der Kanzerogenese (Rountree *et al.* 2001, Robertson 2001) und der Immunabwehr (Goldberg *et al.* 2000, Scheule 2000).

Die Anzahl von m5C-Methylierungen in den Genomen von Eukaryonten unterscheidet sich sehr stark. So sind z.B. im Genom von *Drosophila melanogaster* 0,05-0,1% der Cytosinreste methyliert, während in den Genomen von Säugetieren 2-10% der Cytosinreste methyliert vorliegen (Gowher *et al.* 2000). In höheren Pflanzen fand man m5C-Methylierungen in Höhe von ~6% in *Arabidopsis* (Kakutani *et al.* 1999) und 25% in Blättern der Tomate (Messeguer *et al.* 1991). Zusätzlich ist die Anzahl der m5C-Methylierungen und das Methylierungsmuster während eines Lebenszyklus variabel. Untersuchungen an der Tomate zeigten, daß in den Samen 27,4%, in Keimlingen 20-21%, in ausgewachsenen Blättern 25% und in Pollen ca. 21,9% der Cytosinreste methyliert vorliegen (Messeguer *et al.* 1991).

Cytosinmethylierungen finden sich in den Genomen von Säugetieren hauptsächlich in CG-Motiven (Cytosin-Guanosin-Motive) (Dörfler 1983), von denen 60-90% methyliert vorliegen (Kundu und Rao 1999), dagegen selten in CNG-Sequenzen (Clark *et al.* 1995), in welchen „N“ jedes beliebige Nukleotid sein kann. Die methylierten CG-Motive verteilen sich in Säugergenomen nicht statistisch, sondern treten häufig als „Cluster“ auf. Mit Methylierungen einhergehende funktionelle Unterschiede sind oft bei sogenannten „CpG-Inseln“ zu beobachten. Diese in der Regel unmethylierten „CpG-Inseln“ finden sich häufig im „5'-UTR-Bereich“ (untranslatierte Region) von Promotoren, welche die Expression von Genen,

insbesondere die der Haushaltsgene steuern (Kundu und Rao 1999, Antequera und Bird 1999). Deshalb wird häufig ein direkter Einfluß von Methylierungen auf die Bindungsfähigkeit zwischen Transkriptionsfaktoren und den entsprechenden Bindungsregionen innerhalb der Promotoren diskutiert (Kass *et al.* 1997).

In Pflanzen fand man m5C-Methylierungen mit großer Häufigkeit sowohl in CG- als auch in CNG-Motiven. Diese Motive werden als symmetrische Cytosine bezeichnet, weil sie in beiden komplementären DNA-Strängen vom 5'- zum 3'-Ende gelesen, die gleiche Sequenz besitzen (Grünbaum *et al.* 1981). Seltener, aber dennoch signifikant kommen in pflanzlicher DNA auch asymmetrische bzw. unkonventionelle Methylierungen vor. Diese asymmetrischen Methylierungen in höheren Pflanzen wurden zuerst bei epigenetisch inaktivierten Transgenen in *Petunia* (Meyer *et al.* 1994) und Tabak (Ingelbrecht *et al.* 1994) beobachtet. Gleiche Beobachtungen machten Ronchi *et al.* (1995) bei endogenen Genen der Mais *R*-Genfamilie. Die Gegenwart einer weiteren Kopie eines nicht allelen Gens der *R*-Genfamilie, führte zu einer Reduktion der Expression des homologen endogenen Gens und damit einhergehenden Methylierungen innerhalb der Promotorregion. Bei der Sequenzierung der Promotoren nach einer Modifikation der DNA mit *Na*-Bisulfit fand man neben den konventionellen, symmetrischen Methylierungen in CG- und CNG-Motiven auch m5C-Methylierungen in asymmetrischen Cytosinen. Zur Unterscheidung dieses Phänomens der Reduktion der Expression duplizierter endogener Gene von der klassischen Paramutation wurde es als REED (Reduced Expression of Endogenous Duplications) bezeichnet (Ronchi *et al.* 1995). Oakeley und Jost (1996) identifizierten asymmetrische Cytosinmethylierungen in einer 140 bp-Region des endogenen Promotors für das kodierende Gen eines Auxin-Bindungsproteins in der DNA von Tabakpollen. In dem analysierten Sequenzbereich der DNA des Tabakpollens wurden von insgesamt 49 Cytosinen 10 Cytosine methyliert, 7 dieser m5C-Methylierungen fanden sich in asymmetrischen Positionen. Der gleiche Sequenzbereich der DNA aus Tabakblättern wies keine Methylierungen auf. Jacobson und Meyerowitz (1997) nahmen an, daß Hypermethylierungen im „Superman“-Gen (Gen zur Regulation der Blütenbildung) und Methylierungen in asymmetrischen Cytosinen, von *Arabidopsis* Mutanten mit einer reduzierten MTase-Aktivität, durch einen anderen Mechanismus ausgelöst oder stabilisiert wurden, als bei Pflanzen, in denen repetitive Sequenzen und Methylierungen primär in symmetrischen Cytosinen beobachtet wurden. Auch die in anderen Forschungsarbeiten beobachteten asymmetrischen Methylierungen lassen auf eine spezifische biologische Funktion dieser Methylierungen möglich erscheinen (Timmermans *et al.* 1996, Park *et al.* 1996, Wang *et al.* 1996, Zhou *et al.* 1998).

Traditionell werden m5C-Methylierungen einem postreplikativen Prozeß unterstellt. Deshalb erklärt auch ein einfaches Modell die stabile Weitervererbung des Methylierungsmusters konventioneller, symmetrischer CG- und CNG-Motive während der Mitose. Der semi-konservative Modus der DNA-Replikation begründet die stabile Weitergabe der symmetrischen m5C-Methylierungen beider komplementärer Stränge. Spezifische MTasen erkennen den hemi-methylierten Zustand während des Replikationsprozesses und übertragen postreplikativ eine Methylgruppe analog zum Elternstrang auf den neu synthetisierten Tochterstrang (Grünbaum *et al.* 1982). Das symmetrische Methylierungsmuster kann so über mehrere Generationen erhalten bleiben. Dennoch erklärt dieses Modell nicht die stabile Weitervererbung asymmetrischer Methylierungen während der Zellteilung, hier ist eher anzunehmen, daß strukturelle Elemente das Signal für Methylierungen liefern (Meyer *et al.* 1994). Auch sind die Umstände, die zu spontanen *de novo* m5C-Methylierungen in asymmetrischen Cytosinen führen, bisher ungeklärt. Als Ursache werden unter anderem die Änderung der Sekundärstruktur der DNA (Aranda-Anzaldo 1991, Smith 1998), RNA gesteuerte *de novo* Methylierungen (Wassenegger *et al.* 1994, Wassenegger 2000) und Interaktionen zwischen RNA-RNA, RNA-DNA, bzw. DNA-DNA (Stam *et al.* 1997, Matzke 1998b, Jacobsen 1999) diskutiert.

1.5 Methyltransferasen in Pflanzen

Bei der m5C-Methylierung wird eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf das Kohlenstoff-5 des Pyrimidinringes übertragen. Bei diesem Prozeß kommt es zur Ausbildung eines transienten kovalenten Komplexes zwischen dem Protein und dem Pyrimidin. Ein Cysteinthiol des Enzyms wirkt nukleophil und greift das Kohlenstoffatom-6 an, so daß ein kovalentes DNA-Protein-Intermediat entsteht. Die Addition des Cysteinthiols aktiviert das Kohlenstoffatom-5 und ermöglicht damit die Übertragung der Methylgruppe vom SAM auf das Kohlenstoffatom-5 (Wu und Santi 1987). Von diesen katalytisch wirksamen MTasen sind bisher in Pflanzen drei Klassen, die sich in ihrer Proteinstruktur und Funktion unterscheiden, identifiziert worden. Bestor *et al.* (1988) gelang es erstmals die cDNA des Gens für die MTase *Dnmt1* der Maus zu klonieren. In diesen Studien konnte eine starke Ähnlichkeit der konservierten Proteinmotive zwischen prokaryontischen Enzymen und der *Dnmt1*-MTase nachgewiesen werden. Anhand von Sequenzhomologien gelang es Finnegan und Dennis (1993) eine MTase (*MET1*) von *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren und zu isolieren. Das *MET1*-Gen gehört zu einer kleinen Genfamilie (5 Gene), von denen bisher 4 Gene näher charakterisiert wurden (Finnegan und Dennis 1993, Genger *et al.* 1999, Finnegan und Kovac 2000). Das *MET1*-Gen wird in allen Geweben exprimiert, zeigt aber die

höchste Expression in meristematischen Zellen (Ronemus *et al.* 1996). Die Funktion dieses Enzyms dient vorzugsweise der Erhaltung von Methylierungsmustern. Homologe Gene des *MET1*-Gens wurden in der Karotte, der Erbse, der Tomate und im Mais gefunden (Finnegan und Kovac 2000).

Experimente, in denen die Expression der für die *MET1*-MTase kodierenden Gene, mit Hilfe von „antisense“-Konstrukten reduziert wurde, zeigten, daß die Reduktion der Expression mit einer Abnahme der m5C-Methylierungen korreliert. Im Zusammenhang mit der Reduzierung der Methylierungen wurden abnormale Entwicklungen von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen beobachtet (Finnegan *et al.* 1996). Jacobsen und Meyerowitz (1997) zeigten, daß eine transgene *Arabidopsis*-Linie mit einem „antisense“ MTase-Gen (AMT-Linie) zwar generell eine Abnahme der genomischen Methylierungen aufwies, jedoch mit der Ausnahme eines hypermethylierten Allels des „Superman“-Gens. Epigenetische Mutanten von *Arabidopsis* mit Hypermethylierungen im „Superman“-Gen und reduzierter Transkription zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die transgene AMT-Linie. Diese Beobachtungen lassen auf das Vorhandensein weiterer spezifischer MTasen für *de novo*-Methylierungen schließen.

Unter diesem Aspekt identifizierten Henikoff und Comai (1998) eine zweite Klasse einer Genfamilie von MTasen in Pflanzen, die sogenannten Chromomethyltransferasen (*CMT*). Sie sind durch die Insertion einer Chromodomäne zwischen den konservierten Motiven II und IV der katalytischen Region des Enzyms charakterisiert. Chromodomänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen zwischen Chromatinkomponenten. Zuerst wurden diese Chromodomänen in den Proteinen Polycomb und Heterochromatin1 in *Drosophila* identifiziert. Die Chromodomänen dienen dem Auffinden des Heterochromatins im Nukleus. Die aus *Drosophila* stammenden Chromodomänen waren in der Lage, ein GFP-Reportergen in Tabak zu heterochromatischen Regionen des Interphase-Kerns zu lenken (Ingram *et al.* 1999). Die Expression des Reportergens beeinflusste die Entwicklung vom Blattgewebe. Dieses Phänomen korrelierte mit der Expression eines endogenen Gens, welches in Tabakblättern normalerweise unterdrückt ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß Proteine mit Chromodomänen Teil eines repressiven Komplexes der Genregulation im Heterochromatin sein könnten (Ingram *et al.* 1999). Die Rolle dieser *CMT*-Genfamilie in bezug auf m5C-Methylierungen ist noch weitgehend unklar. Verschiedene Analysen von Pflanzen, in denen die Expression der *CMT*-Gene reduziert oder in denen deren Translation verhindert wurde, zeigen, daß die Funktion dieser MTasen nicht essentiell ist (Genger *et al.* 1999).

Basierend auf Sequenzübereinstimmungen wurden weitere DNA-MTasen in höheren Eukaryonten beschrieben. Zwei dieser MTasen, *Masc1* von *Ascobolus* und *Dnmt3* aus der Maus (Malagnac *et al.* 1997, Okano *et al.* 1998a) sind *de novo*-MTasen, während die dritte, *Dnmt2* (Yoder und Bestor 1998), ein Mausprotein mit unbekannter Funktion ist (Finnegan und Kovac 2000, Review). Anhand von Sequenzhomologien zwischen *Arabidopsis* und der *Masc1*- als auch der *Dnmt2*-MTase kann davon ausgegangen werden, daß beide MTasen ebenfalls in Pflanzen präsent sein könnten (Finnegan und Kovac 2000).

Bisher bleiben jedoch die Fragen offen, wie bestimmte Methylierungsmuster entstehen, welche Mechanismen bei der Mitose und Meiose wirksam werden und welche Proteine zusätzlich zu den MTasen eine Rolle bei der Vererbung von Methylierungsmustern und *de novo*-Methylierungen spielen.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, die Expression und die Stabilität von zwei Transgenen in mehreren aufeinanderfolgenden Selbstungsgenerationen zweier unabhängiger transgener Linien von *Vicia narbonensis* zu untersuchen. Ausgehend von zwei unabhängigen Initialtransformanten mit jeweils einer ins Genom integrierten Kopie der Fremd-DNA wurde eine breit angelegte Generationsanalyse durchgeführt.

In den meisten Forschungsarbeiten über „gene silencing“-Effekte in höheren Pflanzen wurde als Ursache für dieses Phänomen in der Regel das Vorhandensein von homologen DNA-Sequenzen identifiziert. Diese Homologien und das damit einhergehende „gene silencing“ betraf entweder die ins pflanzliche Genom eingebrachten Fremdgene selbst, wenn mehrere Kopien ins Genom integriert wurden, oder endogene Gene, wenn zusätzlich homologe Sequenzen ins Genom integriert wurden. Nur in wenigen Fällen wurde der Verlust oder die Reduktion der Genexpression nach einer Integration einer Kopie der Fremd-DNA beschrieben. Basierend auf diesem Forschungsstand wurden für die Generationsanalyse Pflanzen ausgewählt, die jeweils nur eine Kopie der T-DNA integriert hatten (Pickardt *et al.* 1991).

Da für die Verwendung transgener Pflanzen in Züchtungsprogrammen eine stabile und ausreichende Expression der ins Pflanzengenom integrierten fremden Gene unbedingt erforderlich ist, galt es nicht, die genaue Aktivität der beiden Fremdgene auf transkriptioneller Ebene zu bestimmen, sondern die Frage zu beantworten, ob die gewünschten Eigen-

schaften der Gene generell vermittelt werden. Maßgebend hierfür war ein Hygromycin-resistenztest und der Nachweis der Nopalinproduktion.

Schon im Laufe der ersten Untersuchungen zur Kosegregation der Expression der beiden Transgene (HPT-Gen und NOS-Gen) zeigte sich, daß einige Nachkommen beider unabhängiger transgener Linien einen Verlust der Expression des HPT-Gens aufwiesen. In einer Linie vererbten die Pflanzen den inaktiven Zustand des HPT-Gens stabil an alle Nachkommen weiter, während in der anderen Linie in einigen Pflanzen das HPT-Gen reaktiviert wurde. Die Stammbäume beider Linien konnten jeweils unterteilt werden, in einer das HPT-Gen stabil exprimierenden Sublinie und einer das HPT-Gen instabil exprimierenden Sublinie.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit galt die besondere Aufmerksamkeit dem Phänomen des „gene silencing“ und den in diesem Zusammenhang beobachteten DNA-Methylierungen. Mit Hilfe der Bisulfit-Modifikation der DNA wurden vergleichende Analysen zum Methylierungsstatus der vorgeschalteten Promotoren und einer 200bp-Sequenz der 5'-Enden beider Strukturgene durchgeführt. Insbesondere wurde der Einfluß von starken Temperaturdifferenzen während der Entwicklung der Pflanzen auf den Methylierungsstatus der beiden Fremdgene untersucht. Begleitend erfolgten Northern Blot-Analysen ausgewählter Nachkommen beider Linien.