

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Stabilität von zwei Transgenen in mehreren aufeinanderfolgenden Selbstungsgenerationen zweier unabhängiger transgener Linien von *Vicia narbonensis* untersucht. Die vorgenommenen Untersuchungen bezogen sich auf die stabile Integration, die Mutagenität und die Expression der beiden Transgene.

Die Initialtransformanten der beiden Ausgangslinien 4.1 und 9.1 wurden durch Agrobakterien vermittelte Transformation hergestellt. Die in die Pflanzengenome integrierte T-DNA enthält jeweils ein in höheren Pflanzen aktives HPT-Gen mit dem 35S-Promotor und ein NOS-Gen mit vorgeschaltetem NOS-Promotor (Pickardt *et al.* 1991).

Während der Generationsanalyse galt neben den Untersuchungen zur stabilen Integration, der Mutagenität, der Expression und der Kosegregation der beiden Fremdgene besondere Aufmerksamkeit dem Phänomen des „gene silencing“ und die in diesem Zusammenhang beobachteten m5C-Methylierungen.

4.1 **„Gene silencing“ und Methylierungsstatus von Pflanzen unter klimatisierten Gewächshausbedingungen**

Innerhalb dieser Studie konnten die von Meyer *et al.* (1994) und von Park *et al.* (1996) für transgene Petunien und Tabakpflanzen erzielten Ergebnisse über Hypermethylierungen im Bereich des 35S-Promotors mit einhergehender Geninaktivierung des vom Promotor gesteuerten Strukturgens bestätigt werden. In den untersuchten Nachkommen der transgenen *Vicia narbonensis*-Linie 4.1, welche unter klimatisierten Gewächshausbedingungen wuchsen und eine Inaktivierung des HPT-Gens aufzeigten, fanden sich Hypermethylierungen innerhalb der vorgeschalteten 35S-Promotorregion. So zeigte die Pflanze D1 mit inaktiviertem HPT-Gen Hypermethylierungen im Bereich des 35S-Promotors, während die Pflanze E2, welche das HPT-Gen exprimiert, nur eine geringfügige Anzahl von m5C-Methylierungen innerhalb des 35S-Promotors aufwies. Beide Pflanzen exprimierten jedoch das NOS-Gen stabil. Entsprechend korrelieren hier die Ergebnisse aus den Methylierungsanalysen des NOS-Promotors, da innerhalb dieser Sequenz nur eine geringe Anzahl von m5C-Methylierungen in beiden Pflanzen gefunden wurden. Auch innerhalb der untersuchten 200bp-Sequenzen der 5'-Enden des NOS-Gens und des HPT-Gens enthielten beide Pflanzen nur wenig Methylierungen. Durchgeführte Northern Blot-Analysen (Abb. 15a,b u. 16a,b) unterstützen diese Ergebnisse.

Interessant ist, daß es sich in diesem Fall um Pflanzen mit einer Einzelkopie-Integration handelt (Pickardt *et al.* 1991). Bisher wurde in wenigen Arbeiten ein „gene silencing“-Effekt nach der Integration von nur einer T-DNA-Kopie beschrieben (Meyer *et al.* 1993, Elmayan und Vaucheret 1996, Meza *et al.* 2001). Dagegen wurden häufig Geninaktivierungen nach der Integration von homologen Sequenzen beobachtet (Matzke und Matzke 1998a, Kooter *et al.* 1999).

Parallel zu den Northern Blot-Analysen der Pflanzen der Linie 4.1 wurden Proben von Pflanzen der Linie 9.1, welche in klimatisierten Gewächshäusern kultiviert wurden, ebenfalls diesen Analysen unterzogen. Alle untersuchten Pflanzen der Linie 9.1, die im Hygromycin-resistenztest negativ waren, wiesen keine Expression des HPT-Gens auf, während resistente Pflanzen eine Expression zeigten (Abb. 16a,b). Diese Ergebnisse bestätigen den „gene silencing“-Effekt, der im Hygromycinresistenztest beobachtet wurde. Alle analysierten Pflanzen beider Linien zeigten im Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität eine stabile Expression des NOS-Gens und wiesen in den Northern Blot-Analysen ein entsprechendes Hybridisierungssignal auf. Auffällig ist lediglich, daß alle Pflanzen der Linie 4.1 im Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität generell etwas weniger Nopalin produzierten als die Pflanzen der Linie 9.1 (s. Punkt 3.2.2, Abb. 6). Ursache hierfür könnte ein Positionseffekt sein. Die Integration eines Transgens erfolgt durch illegitime Rekombination in beliebige Regionen des Genoms, so daß die Stabilität und die Expression der eingefügten Fremdgene von den Eigenschaften des Integrationsortes mitbestimmt werden können (Ambros *et al.* 1986, Chyi *et al.* 1986, Nagy *et al.* 1986, Wallroth *et al.* 1986, Paszkowski *et al.* 1988). Peach und Velten (1991) zeigten in Experimenten mit transgenen Tabakpflanzen eine quantitative Variation der Expression von den zwei gekoppelten Reportergenen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und β -Glucuronidase (GUS). Die Autoren nehmen als primäre Ursache der Variabilität in der Genexpression eine positionsabhängige Modifikation der Promotoraktivität an. Auch Pröls und Meyer (1992) kamen zu dem Schluß, daß integrierte Fremdgene abhängig von den Eigenschaften der flankierenden DNA-Sequenzen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß innerhalb dieser Arbeit Geninaktivierungen in Nachkommen transgener homozygoter *Vicia narbonensis*-Linien, welche eine Kopie der T-DNA ins Genom integriert hatten, beobachtet werden konnten. Beide in höheren Pflanzen aktiven Fremdgene wurden in funktionsfähiger Form ins Genom der Pflanzen integriert und nach den Mendelschen Regeln an die Nachkommen weitervererbt. Mutationen innerhalb der beiden Gene und Promotoren konnten ausgeschlossen werden, so daß epigenetische Einflüsse als Ursache der Inaktivierung des HPT-Gens angenommen werden müssen.

4.1.1 Einfluß repetitiver DNA-Sequenzen

In vielen Fällen ist das Vorhandensein homologer DNA-Sequenzen Voraussetzung für das Auftreten von Geninaktivierungen. Hierbei kann die Homologie nur die Promotorregion betreffen oder die kodierenden Regionen (Matzke *et al.* 1989, Matzke und Matzke 1991). Von diesem „gene silencing“-Effekt können sowohl homologe transgene Kopien, unabhängig davon, ob sie als direkte, indirekte oder invertierte Sequenzwiederholungen ins Genom integriert wurden, betroffen sein (Hobbs *et al.* 1990, Linn *et al.* 1990, Ottaviani *et al.* 1993) als auch endogene Gene, wenn Homologien zwischen der eingebrachten Fremd-DNA und den endogenen Genen bestehen (Van der Krol 1990, Baulcombe und English 1996, Depicker und Van Montagu 1997).

TGS ist in der Regel mit der Integration von mehr als einer transgenen Kopie und damit einhergehenden Hypermethylierungen im Promotorbereich und/oder Änderungen in der Chromatinstruktur des transgenen Lokus assoziiert (Kilby *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1993, Assaad *et al.* 1993, Neuhuber *et al.* 1994, Park *et al.* 1996, Mittelsten-Scheid *et al.* 1998, Furner *et al.* 1998). Im Gegensatz hierzu wurden bei PTGS häufig *de novo* Methylierungen in der kodierenden Sequenz der Transgene beobachtet (Hobbs *et al.* 1993, Ingelbrecht *et al.* 1994, English *et al.* 1996, Van der Houdt *et al.* 1997). Ferner konnte gezeigt werden, daß TGS im Gegensatz zum PTGS stabil über die Meiose vererbt wurde. Der Inaktive Zustand und die damit einhergehenden Hypermethylierungen innerhalb der Promotorregion wurden an die Nachkommen weitergegeben (Park *et al.* 1996, Morino *et al.* 1999). Auch bei den hygromycinsensitiven Nachkommen der Linie 4.1 wurde der inaktive Zustand des HPT-Gens stabil weitervererbt. Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, ob die beobachtete Inaktivierung des HPT-Gens auf transkriptioneller Ebene stattfindet, oder ob ein post-transkriptioneller Prozeß diesem „gene silencing“-Effekt zugrunde liegt. Dennoch deuten die Indizien daraufhin, daß es sich bei den hygromycinsensitiven Nachkommen der Linie 4.1 um ein „silencing“ auf transkriptioneller Ebene handelt. Unter diesen Umständen wäre denkbar, daß TGS durch die Integration von zwei T-DNA-Kopien im gleichen Lokus, d.h. in „cis“-Orientierung verursacht worden sein könnte. Bei dieser Tandem-Anordnung könnte es zu einer Paarung von homologen Sequenzabschnitten kommen. Eine daraus resultierende Änderung in der Sekundärstruktur des Chromatins z.B. in der Form von Heterochromatin könnte die Ursache einer „cis“-Inaktivierung sein (Vaucheret und Fagard 2001).

Nicht auszuschließen ist, daß Sequenzumlagerungen in der linken Borderregion einen Einfluß auf die Chromatinstruktur und/oder damit verbunden auf den Grad der

Methylierungen innerhalb der 35S-Promotorregion ausüben könnten. Wie den Southern Blot-Analysen zu entnehmen ist (Abb. 7b), wurde das interne *HindIII*-Fragment in allen untersuchten Pflanzen komplett integriert. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß Sequenzumlagerungen, welche das interne *HindIII*-Fragment nicht direkt betreffen, Einfluß auf die Chromatinstruktur und den Methylierungsstatus des 35S-Promotors nehmen könnten (Stam *et al.* 1998). Hierbei könnten repetitive Sequenzabschnitte einerseits durch Insertionsmutagenese in der genomischen DNA des Integrationsortes oder innerhalb der Sequenzbereiche der linken Borderregion entstanden sein. Aufgrund von illegitimer Rekombination (Mayerhofer *et al.* 1991) sind T-DNA Insertionen oft rearrangiert, besonders in der Verbindungsregion zwischen T-DNA und chromosomaler DNA (Simpson *et al.* 1982). Auch könnten bereits im Integrationsort vorhandene endogene repetitive Sequenzen zum „gene silencing“ beitragen. Die häufig beobachtete Korrelation zwischen dem Auftreten des „gene silencing“ und dem Vorhandensein von repetitiven Sequenzen haben zu der Hypothese beigetragen, daß Einzelkopie-Integrationen stabiler exprimiert werden als Integrationen mit repetitiven Sequenzwiederholungen. Wenig ist bisher über die genomische Umgebung innerhalb des Integrationsortes bekannt. In nur wenigen Arbeiten wurden die flankierenden DNA-Sequenzen des Integrationsortes sequenziert. Diese Sequenzierungen betrafen lediglich einige Kilobasen flankierender Sequenzen der linken und rechten Borderregionen, so daß bisher wenig über die chromosomale Umgebung der Integrationsorte ausgesagt werden konnte (Matzke *et al.* 2000).

Ten Lohuis *et al.* (1995) zeigten, daß eine 1,6 kbp große repetitive DNA-Sequenz von *Petunia hybrida* die Expression eines im gleichen Vektor vorhandenen GUS-Markergens in Petunien und Tabak destabilisieren konnte. Die Reduktion der Expression in Gegenwart der repetitiven Sequenzen wurde sowohl in Kalluskulturen als auch in den regenerierten Pflanzen beobachtet. Es wurde angenommen, daß die repetitiven Sequenzen als Auslöser für die Inaktivierung des Chromatins auch benachbarter Regionen fungieren könnten. In der Tat wurden Sequenzen in der Nähe des Zentrums von invertierten Sequenzwiederholungen stärker methyliert als Sequenzen distal vom Zentrum. Diese verschiedenen Methylierungsmuster korrelierten mit der Expression von Transgenen. Das in der Nähe des Zentrums lokalisierte Transgen wurde transkriptionell inaktiviert, während das mehr distal gelegene Gen nicht inaktiviert wurde (Stam *et al.* 1998).

Repetitive Sequenzen sind oft methyliert und heterochromatisch, wodurch eine transkriptionelle Inaktivierung verursacht werden kann. Das Genom von *Drosophila* enthält nur eine sehr geringe Anzahl von Cytosinmethylierungen (Gowher *et al.* 2000) und invertierte Sequenzwiederholungen werden als Heterochromatin verpackt (Dorer und Henikoff 1994).

Für Organismen, in denen sowohl Methylierungen, als auch Konformationsänderungen in der Chromatinstruktur bei der Genregulation eine Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob die Konformationsänderung des Chromatins eine Folge der Methylierungen ist, oder ob Methylierungen durch die Änderungen in der Chromatinstruktur ausgelöst werden (Muskens *et al.* 2000). Generell scheinen beide Möglichkeiten vorzukommen. So können Methylierungen innerhalb der DNA die Bindungen von spezifischen Methylcytosin bindenden Proteinen, z.B. von Methyl-CpG-Bindungsproteinen in Säugern bewirken. Diese Proteine interagieren mit einem Ko-Repressor Komplex. Als Folge davon kommt es zu Deacetylierungen der Histone (Nan *et al.* 1998, Wade *et al.* 1999, Ng und Bird 1999). Andererseits konnte durch die Inhibition von Histondeacetylasen ein Verlust von Methylierungen in *Neurospora* verursacht werden (Selker 1998). Eine Reduktion der Histondeacetylase ATHD1 führte in *Arabidopsis* zu pleiotropischen Effekten in der Genregulation während der Entwicklung (Wu *et al.* 2000, Tian *et al.* 2001).

Interessant ist, daß bei den Pflanzen der Linie 4.1, die eine Inaktivierung des HPT-Gens aufweisen, innerhalb der 35S-Promotorregion beide Bindungsstellen für den ASF1-Transkriptionsfaktor methyliert wurden. Die Bindung des Transkriptionsfaktors könnte durch diese Methylierungen direkt verhindert worden sein, oder indirekt durch oben erwähnte Methyl-CpG-Bindungsproteine.

4.1.2 Zeitpunkt der Geninaktivierung

Zu beantworten bleibt die Frage, zu welchem Zeitpunkt eine Geninaktivierung auftritt. Auch hier ist davon auszugehen, daß mehrere Mechanismen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wirksam werden, da nicht alle Pflanzen einer Aussaat zu einem bestimmten Zeitpunkt von der Inaktivierung des HPT-Gens betroffen waren.

Zwar manifestiert sich in der Linie 4.1 der „gene silencing“-Effekt in der Nachkommenschaft der Pflanze 4.1.6.1.4.3 (s. tabellarischen Stammbaum Tab. 3), dennoch ist nicht zu klären, welche Ursachen zur Geninaktivierung in diesen Nachkommen geführt haben könnten.

Parallel zu den Nachkommen dieser Pflanzen wuchsen Nachkommen aus der das HPT-Gen stabil exprimierenden Sublinie und der das HPT-Gen instabil exprimierenden Sublinie der Linie 9.1 unter den gleichen Bedingungen im Gewächshaus. Beide Sublinien zeigten keine Änderungen hinsichtlich der Stabilität des HPT-Gens.

Bei der Linie 9.1 war ein „gene silencing“ des HPT-Gens das erste Mal in den Nachkommen der Pflanzen 9.1.19.4.4 und 9.1.19.4.16 (T3) zu beobachten (s. tabellarischen Stammbaum Tab. 6). Im Gegensatz zu den Nachkommen der Pflanze 4.1.6.1.4.3 trat dieser „gene silencing“-Effekt jedoch nicht bei allen Nachkommen gleichzeitig auf. So zeigten noch 23 von 27 Nachkommen der Pflanze 9.1.19.4.4 und 16 von insgesamt 18 Nachkommen der Pflanze 9.1.19.4.16 eine Resistenz vermittelnde Expression des HPT-Gens. Im Laufe der folgenden Generationen manifestierte sich in den meisten Nachkommen der instabilen Sublinie der Linie 9.1 das Phänomen des „gene silencing“ bis hin zum kompletten Resistenzverlust in ganzen Nachkommenschaften. Andererseits zeigten alle Nachkommen der Pflanze 9.1.19.4.4.13.20 (T5) wieder eine Resistenz vermittelnde Expression des HPT-Gens.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß Umwelteinflüsse zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein „gene silencing“ des HPT-Gens in beiden unabhängigen transgenen *Vicia narbonensis*-Linien auslösen können, und daß epigenetische Änderungen in beiden Linien zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Geninaktivierung führen, da in den Nachkommen der Linie 9.1 immer wieder Reversionen zu beobachten waren. Auch in *Arabidopsis* wurde „gene silencing“ im Laufe der Entwicklung der ersten Generationen oder in späteren Generationen beobachtet (Mittelsten-Scheid *et al.* 1995).

Grundsätzlich gehören DNA-Methylierungen und damit einhergehende Inaktivierungen von endogenen Genen zu den natürlichen regulatorischen Mechanismen während der Entwicklung. Aus einigen Studien geht hervor, daß verschiedene „gene silencing“-Effekte durch einen Abwehrmechanismus gegen artfremde parasitische DNA z.B. von Viren (Baulcombe 1996, Kasschau *et al.* 1998, Baulcombe 1999), Viroiden (Wassenegger *et al.* 1994, Pelissier *et al.* 1999), Bakterien oder Transposable Elemente (Turker und Bestor 1997) verursacht werden können. Bei Transformationen werden häufig während der Integration von Fremd-DNA durch illegitime Rekombination auch prokaryontische Vektorsequenzen mit ins pflanzliche Genom integriert (Matzke und Matzke 1998). Oftmals werden diese Vektorsequenzen methyliert, wobei sich diese Methylierungen auf benachbarte Transgene ausdehnen können (Jakowitsch *et al.* 1999, Matzke *et al.* 2000). Möglich ist auch, daß ungewöhnliche Sequenzkompositionen, wie z.B. ein hoher GC-Gehalt (Jakowitsch *et al.* 1999), oder fehlende Bindungsstellen für eukaryontische nukleare Proteine bevorzugte Bereiche für pflanzliche Methyltransferasen darstellen (Matzke *et al.* 2000).

Die hier untersuchten transgenen *Vicia narbonensis*-Linien enthalten innerhalb der integrierten T-DNA neben den beiden in Pflanzen aktiven Strukturgenen zusätzlich ein Streptomycin-/Spectinomycinresistenzgen und ein ca. 350 bp-Fragment des Ampicillin-

resistenzgens. Diese Sequenzen sind zwischen der linken Border und dem HPT-Gen in der T-DNA lokalisiert (Abb.2). Möglich wäre, daß diese in Pflanzen nicht aktiven Sequenzen Abwehrmechanismen auslösen, und als Folge davon spezifische Methyltransferasen zur Methylierung von artfremder DNA mobilisiert werden.

Es ist anzunehmen, daß erst durch die Koordination von mehreren Faktoren ein „gene silencing“-Effekt auftritt. Grundsätzlich sind der Integrationsort, die Chromatinstruktur, Insertionsmutagenese, Rearrangements, repetitive Sequenzen und das Zusammenspiel von Methylasen, Demethylasen, Acetylasen und Deacetylasen von entscheidender Bedeutung.

4.2 „Gene silencing“ und Methylierungsstatus von Pflanzen unter nicht klimatisierten Gewächshausbedingungen

Aus vielen Studien geht hervor, daß die Stabilität der Transgenexpression von verschiedenen unerwarteten Faktoren beeinflusst werden kann. So können z.B. Kulturbedingungen ausschlaggebend für die Expression bzw. die Inaktivierung von Transgenen sein. Von Hart *et al.* (1992) wurden „gene silencing“-Effekte gehäuft in Pflanzen vorgefunden, die in geschlossenen Kulturgefäßen auf Nährmedium kultiviert wurden. Seltener trat dieser Effekt in Pflanzen auf, die auf Erde kultiviert wurden. Durch Umwelteinflüsse wurde in diesem Fall eine Kosuppression ausgelöst.

Brandle *et al.* (1995) beschreiben eine Ko-Suppression in transgenen Tabakpflanzen, die ebenfalls durch Behandlung junger Pflanzen beeinflusst werden konnte. Transgene homozygote Tabakpflanzen, welche ein Chlorsulfuronresistenzgen aus Arabidopsis ins Genom integriert hatten, waren in den durchgeführten Versuchen im Gewächshaus stabil resistent gegen Chlorsulfuron. Das ins Tabakgenom integrierte Fremdgen kodiert ein mutiertes, Chlorsulfuron stabiles Enzym. Endogen enthalten die transformierten Tabakpflanzen eine chlorsulfuronsensitive Variante dieses Enzyms. Im Gegensatz zu den Versuchen im Gewächs verloren bis zu 59% der homozygoten Pflanzen im Freiland die Herbizidresistenz. Nachkommen von geselbsteten Pflanzen aus dem Freiland waren unter Gewächshausbedingungen jedoch wieder herbizidresistent. Unabhängig von der phänotypischen Erscheinungsform der Eltern, wurde die Resistenz an die Nachkommen weitergegeben. Als Ursache für das Auftreten der Kosuppression wurde die agronomische Praxis während des Transfers der Pflanzen vom Gewächshaus aufs Feld angenommen. Pflanzen, die vor der Auspflanzung ins Freiland nicht nochmals umgetopft wurden, behielten die Resistenz vermittelnden Eigenschaften (Brandle *et al.* 1995).

In einem Freilandversuch mit transgenen Petunien, die ein Dihydroflavonol-4-Reduktasegen (A1) aus *Zea mays* enthielten, kam es ebenfalls zu unvorhersehbaren Ergebnissen (Meyer *et al.* 1992). Zur Identifizierung eines Transposons aus *Petunia hybrida* wurde das Mais (A1) Gen in weiß blühende *Petunia*-Mutanten transferiert. Bei einer stabilen Expression des Transgens zeigen die transgenen Mutanten eine lachsrote Blütenfarbe. Wenn jedoch wie erhofft, das in diesen Experimenten zu identifizierende Transposon in das Transgen hineinspringt, und damit das Gen zerstört, sollten in diesen sehr seltenen Ereignissen die transgenen Mutanten wieder eine weiße Blütenfarbe hervorbringen. In Freilandversuchen zeigte sich dann aber, daß die überwiegende Anzahl der Pflanzen eine lachsrote Blütenfarbe mit unterschiedlichen Intensitäten ausbildeten. Nähere Analysen der Pflanzen ergaben, daß die schwach rot gefärbten Blüten einen erhöhten Methylierungsgrad der transgenen Sequenzen aufwiesen (Meyer und Heidmann 1994). Als Ursache, die zur Geninaktivierung führte, wurden die hohen Lichtintensitäten im Freilandversuch und entwicklungspezifische Einflüsse angenommen (Meyer *et al.* 1992, Meyer und Heidmann 1994). Den Einfluß besonders hoher Temperaturen im Freiland schlossen die Autoren aus, da in den Gewächshäusern zeitweise noch höhere Temperaturen herrschten.

Andere Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, daß Temperaturerhöhungen während der Pflanzenanzucht in transgenen Tabakpflanzen (Conner *et al.* 1998), in Reis (Morino *et al.* 1999) und in *Arabidopsis* (Meza *et al.* 2001) zum „gene silencing“ beitragen können.

Methylierungsanalysen der 35S-Promotorregion und der 224bp-Sequenz des 5'-Endes des HPT-Gens transgener *Vicia narbonensis*-Pflanzen beider Linien, welche über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten starken Temperaturstreß im nicht klimatisierten Gewächshaus ausgesetzt waren, zeigten, daß diese Pflanzen sowohl in der 35S-Promotorsequenz als auch in der Sequenz des HPT-Gens stark hypermethyliert waren (Tab. 16 u. 17). Diese Hypermethylierungen betrafen sowohl die Pflanze M8 der Linie 9.1, die zum Zeitpunkt des Explanttests auf hygromycinhaltigem Medium hygromycinsensitiv war, als auch Pflanzen, die zu diesem Zeitpunkt eine Hygromycinresistenz aufwiesen. Unterschiede in der Anzahl der Methylierungen zwischen den hygromycinresistenten Pflanzen und der hygromycinsensitiven Pflanze M8 zeigten zwei untersuchte PCR-Klone dieser Pflanze. Diese beiden klonierten Ampflifikate enthielten erheblich mehr Methylierungen. Bis zu 61,8% der Cytosine waren in diesen Sequenzbereichen methyliert.

Im Gegensatz hierzu änderte sich der Methylierungsstatus der NOS-Promotorsequenz und der untersuchten 200bp-Sequenz des 5'-Endes des NOS-Gens im Vergleich zu den Pflanzen, welche unter klimatisierten Gewächshausbedingungen kultiviert wurden, nur

geringfügig (vergl. Tab. 10 u. 11 mit Tab. 14 u. 15). Lediglich zwei PCR-Klone der Pflanze M8 aus der Linie 9.1 zeigten hier eine leichte Erhöhung der Anzahl von m5C-Methylierungen innerhalb dieser Sequenzen (Tab. 14 u. 15). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Nachweis der Nopalinsynthaseaktivität, da alle Pflanzen sowohl unter klimatisierten als auch unter nicht klimatisierten Gewächshausbedingungen Nopalin produzierten.

Denkbar wäre, daß unter extremen Streßbedingungen gezielt bestimmte DNA-Sequenzen methyliert werden. Ob diese Methylierungen einen Einfluß auf die Expression des HPT-Gens zu einem späteren Zeitpunkt während der Entwicklung der Pflanzen ausübten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, daß diese *de novo* Methylierungen in den Folgegenerationen keinen Einfluß auf die Expression des HPT-Gens ausübten. Die Nachkommen der Pflanzen T3 (4.1.6.2.11.12.3) und R4 (4.1.6.2.10.14.4) der Sublinie der Linie 4.1, in welcher das HPT-Gen stabil exprimiert wurde, waren im Explantattest auf hygromycinhaltigem Medium ebenfalls hygromycinresistent (s. tabellarischer Stammbaum Tab. 2). Nicht auszuschließen ist, daß einige dieser *de novo* Methylierungen in der Meiose weitervererbt wurden, welche dann zu einem späteren Zeitpunkt während der Entwicklung oder erst in späteren Generationen zum „gene silencing“ führen könnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung der Zunahme von Methylierungen in einigen klonierten PCR-Amplifikaten der Pflanze M8. Sowohl in analysierten Sequenzen des 35S-Promotors, des HPT-Gens, des NOS-Promotors und des NOS-Gens wurde eine Zunahme der m5C-Methylierungen beobachtet. Denkbar wäre, daß unter starken Streßbedingungen bereits methylierte Regionen ein Ziel für weitere zusätzliche *de novo* Methylierungen darstellen, und als Folge davon eine Ausbreitung der Methylierungen auf benachbarte Sequenzen resultiert. Wenn sich einige dieser *de novo* Methylierungen im Laufe der Generationen unter Streßbedingungen manifestieren würden, könnte dadurch in Folgegenerationen ein „gene silencing“ verursacht werden.

4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb der Generationsanalyse konnte nachgewiesen werden, daß in zwei unabhängigen homozygoten transgenen *Vicia narbonensis*-Linien zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein „gene silencing“ des HPT-Gens auftrat, während das NOS-Gen über alle untersuchten Generationen stabil exprimiert wurde. Beide Linien hatten sowohl das HPT-Gen als auch das NOS-Gen in funktionsfähiger Form ins Genom integriert, so daß die Inaktivierung des HPT-Gens auf epigenetische Einflüsse zurückzuführen ist. Im Zusammenhang mit dem „gene silencing“ des HPT-Gens wurden Hypermethylierungen innerhalb des 35S-Promotors

beobachtet. In Northern Blot-Analysen wiesen alle untersuchten Pflanzen, welche das HPT-Gen nicht mehr exprimierten, einen Verlust der mRNA auf.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß epigenetische Änderungen in beiden Linien zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Genaktivierung führten. Beide Linien ließen sich in eine das HPT-Gen stabil exprimierende und eine das HPT-Gen instabil bzw. nicht mehr exprimierende Sublinie unterteilen. In der Linie 4.1 manifestierte sich der „gene silencing“Effekt in der gesamten Nachkommenschaft einer Pflanze und wurde stabil an die nächsten Generationen weitervererbt. Hingegen waren in der Linie 9.1 bei einigen Nachkommen immer wieder Reversionen zu beobachten.

Ferner wurde während der Methylierungsanalysen eine Zunahme der m5C-Methylierungen in der 35S-Promotorregion und der analysierten 224bp-Sequenz des 5'-Endes des HPT-Gens, bei Pflanzen beobachtet, welche starken Temperaturstress in nicht klimatisierten Gewächshäusern ausgesetzt waren. Auch Pflanzen beider Linien, welche zum Zeitpunkt des Explantattests hygromycinresistent waren, wiesen unter Stressbedingungen ebenfalls Hypermethylierungen in der 35-Promotorregion und der untersuchten Sequenz des HPT-Gens auf. Dagegen war im NOS-Promotor und in der analysierten 200bp-Sequenz des 5'-Endes des NOS-Gens nur eine geringfügige Zunahme der m5C-Methylierungen zu beobachten.

Interessant wäre eine nähere Aufklärung der Struktur der integrierten T-DNA und der genomischen Umgebung des Integrationsortes in beiden unabhängigen transgenen *Vicia narbonensis*-Linien. Um weitere Informationen darüber zu erhalten, ob während der Integration der T-DNA ins Genom Sequenzumlagerungen stattgefunden haben, wäre eine Sequenzierung der Borderregionen der integrierten Fremd-DNA und benachbarter genomischer Bereiche erforderlich.

„Run-on“-Experimente können Aufklärung darüber liefern, ob die beobachteten Geninaktivierungen auf transkriptioneller oder auf posttranskriptioneller Ebene stattgefunden haben. Eine Durchführung dieser Experimente zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen könnte zusätzlich Aufschluß darüber geben, ob gegebenenfalls PTGS zu einem späteren Zeitpunkt während der Entwicklung beider unabhängiger transgener *Vicia narbonensis*-Linien auftritt. Ein solcher Vergleich zwischen Pflanzen, die unter gemäßigten Bedingungen kultiviert werden und Pflanzen welche unterschiedlichen Stressfaktoren, wie z.B. hohe Lichtintensitäten und/oder hohen Temperaturen ausgesetzt werden, könnte klären, ob durch diese Stressbedingungen reversibles PTGS verursacht werden kann.