

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 201 67 430/2
UBA-FB 000368



**Verbundprojekt „Grundlagen für die
Risikobewertung transgener Gehölze“**

Literaturstudie zur

**Stabilität transgen-vermittelter
Merkmale in gentechnisch veränderten
Pflanzen mit dem Schwerpunkt
transgene Gehölzarten und
Stabilitätsgene**

von

Dr. Thomas Pickardt

Dr. André de Kathen

BioTechConsult, Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes und des
Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten
des Landes Schleswig-Holstein

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 7,50 Euro

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in dem Bericht geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.5
Ina Ebert

Berlin, Oktober 2002

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 000386	2.	3.
4. Titel des Berichts Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölzarten und Sterilitätsgene.		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Pickardt, Thomas De Kathen, André	8. Abschlussdatum Juni 2002	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) BioTechConsult Pestalozzistr. 35 10627 Berlin	9. Veröffentlichungsdatum Oktober 2002	
	10. UFOPLAN-Nr. FKZ 201 67 430/2	
	11. Seitenzahl 126	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, 14191 Berlin Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Postfach 50 09, 24062 Kiel	12. Literaturangaben 289	
	13. Tabellen und Diagramme 8	
	14. Abbildungen 9	
	15. Zusätzliche Angaben	
16. Zusammenfassung Die vorliegende Literaturstudie befasst sich mit den Ursachen und Faktoren, die die Stabilität transgener Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen beeinflussen, sowie mit den gegenwärtig existierenden, auf gentechnischen Verfahren beruhenden Systemen zur Erzeugung steriler Pflanzen. Transgene Gehölzpflanzen erfahren dabei besondere Berücksichtigung. Die Studie soll als Grundlage für die Erörterung der Fragestellung dienen, welche Erwartungen und Ansprüche an biologische <i>Confinements</i> durch die Übertragung von Sterilitätsgenen gestellt werden können, wie sich die Risiken einer Reversion zu fertilen Formen minimieren lassen und wo die Grenzen eines solchen Sicherheitskonzeptes liegen.		
17. Schlagwörter Gentechnik, transgene Pflanzen, Merkmalsstabilität, <i>gene silencing</i> , Gehölze, Sterilitätsgene, <i>confinement</i>		
18. Preis 7,50 €	19.	20.

Berichts-Kennblatt 06/2000

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 000386	2.	3.
4. Report Title Stability of transgenic traits in genetically modified plants, with the main emphasis on woody species and sterility genes.		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Pickardt, Thomas De Kathen, André		8. Report Date June 2002
6. Performing Organisation (Name, Address) BioTechConsult Pestalozzistr. 35 10627 Berlin		9. Publication Date October 2002
7. Funding Agency (Name, Address) Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency) Postfach 33 00 22, 14191 Berlin Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein (Ministry of the Environment, Nature and Forestry of the Federal State of Schleswig-Holstein), Postfach 50 09, 24062 Kiel		10. UFOPLAN-Ref. No. FKZ 201 67 430/2
		11. No. of Pages 126
		12. No. of Reference 289
		13. No. of Tables, Diagrams 8
		14. No. of Figures 9
15. Supplementary Notes		
16. Abstract This study deals with the causes and factors, which influence the stability of transgenic traits in genetically modified plants, and the currently available systems for the production of sterile plants. Transgenic woody species receive particular consideration. The study supplies a base for addressing the question of which expectations and demands on biological <i>confinement</i> by transfer of sterility-genes are realistic, and how the chance and probability of reversion to fertile forms can be minimized.		
17. Keywords Gene technology, transgenic plants, trait stability, gene silencing, woody plants, sterility genes, confinement		
18. Price 7,50 €	19.	20.

Report Cover Sheet 06/2000

Vorwort

Eine weltweit steigende Anzahl von Gehölzfreisetzungen und erste in Verkehr gebrachte Gehölzsorten machen die rasante Entwicklung deutlich, die sich in den letzten Jahren bei der gentechnischen Veränderung von Gehölzen vollzogen hat. Im Gegensatz dazu ist das Wissen über Auswirkungen transgener Gehölze auf die Umwelt noch sehr lückenhaft. Vor allem zu den Langzeitwirkungen liegen keine Erfahrungen vor und die Sicherheitsforschung steht hier noch am Anfang.

Aufgrund ihrer Langlebigkeit ist eine Abschätzung des Risikos von Freisetzungen und Inverkehrbringen von Gehölzen besonders problematisch. Bei einem Risikomanagement muss den Besonderheiten von Gehölzen wie Frosthärte, Wurzelwachstum, Wuchshöhe und der langen Lebensdauer durch entsprechende Sicherheitsmaßnahmen Rechnung getragen werden. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Etablierung sogenannter „biologischer Confinements“ diskutiert. Darunter werden gentechnisch eingebaute „Schranken“ verstanden, welche die Ausbreitung über Pollen und Samen verhindern, indem sie z.B. eine männliche und/oder weibliche Sterilität bewirken. Voraussetzung für die Zuverlässigkeit und Sicherheit solcher Mechanismen ist allerdings deren lang andauernde hohe Stabilität.

Die vorgelegte Studie dokumentiert umfassend den Wissens- und Diskussionsstand zum Thema „Merkmalsstabilität in transgenen Pflanzen“ und setzt sich mit den Faktoren und möglichen Ursachen für die Instabilität auseinander. Darüber hinaus werden speziell die Möglichkeiten und die Grenzen von stabilen Sterilitätsmechanismen als „biologische Confinements“ in transgenen Pflanzen aufgezeigt. Für langlebige Gehölzarten wird dabei der kombinierte Einsatz mehrerer unabhängiger Sterilitätsmechanismen vorgeschlagen, da gegenwärtig einzelne Merkmale wie z.B. eine Pollensterilität allein, noch keine ausreichende Sicherheit gewährleisten.

Diese Studie ist ein erstes abgeschlossenes Teilvorhaben eines Verbundprojektes des Umweltbundesamtes mit dem Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, dessen Ziel es ist, die Grundlagen für Risikobewertung und –management bei der Freisetzung und dem Inverkehrbringen gentechnisch veränderter Gehölze zu verbessern. Dazu soll neben Fragen der Genstabilität auch der vertikale Gentransfer betrachtet werden. Das Vorhaben besteht aus einem fachli-

chen Verbund von sechs vernetzten Teilprojekten. Sowohl verschiedene Gehölzarten (Aspe, Lärche, Rose, Rhododendron) als auch unterschiedliche theoretische und experimentelle Methoden kommen zur Anwendung. Das Verbundprojekt hat eine Laufzeit von drei Jahren und endet im Frühjahr 2004.

Informationen zum Projekt sowie Zwischenergebnisse können über www.umwelt.schleswig-holstein.de und www.umweltbundesamt.de abgerufen werden.

Ina Ebert und Sarah Drießen, Projektkoordinatorinnen am Umweltbundesamt und MUNF Schleswig-Holstein

Berlin im Oktober 2002

INHALTSVERZEICHNIS

VORBEMERKUNG	III
ABKÜRZUNGEN	IV
1 PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER LITERATURSTUDIE	1
2 EINLEITUNG	4
2.1 BEDEUTUNG DER GENTECHNIK IN LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT	4
2.2 STABILITÄT TRANSGEN-VERMITTELTEN MERKMALE	5
2.2.1 Verlust des transgenen Merkmals durch Sequenzverlust oder –änderung	6
2.2.2 Verlust des transgenen Merkmals bei unveränderter Basensequenz.....	7
2.3 URSACHEN DER INSTABILITÄT TRANSGENER MERKMALE	12
2.4 BEDEUTUNG DER INSTABILITÄT TRANSGENER MERKMALE FÜR DIE ANWENDUNG DER „GRÜNEN“ GENTECHNIK.....	15
2.4.1 Wirtschaftliche Aspekte	15
2.4.2 Ökologische Aspekte	15
3 DOKUMENTATION	17
3.1 ANMERKUNGEN ZUR RELEVANTEN LITERATUR	17
3.2 GLIEDERUNG DER DOKUMENTATION	18
3.3 PHÄNOMENOLOGISCHE BETRACHTUNG DER VERSCHIEDENEN FORMEN DER INSTABILITÄT	21
3.4 BEDEUTUNG DER EIGENSCHAFTEN DES TRANSGENEN LOCUS IN ZUSAMMENHANG MIT DER INAKTIVIERUNG VON GENEN DURCH <i>GENE SILENCING</i>	24
3.4.1 Positionseffekte: Einfluss durch den genomischen Kontext.....	25
3.4.2 Instabilität durch Integration von Vektor-Sequenzen.....	30
3.4.3 Komplexität durch Sequenzumlagerungen am Integrationsort und multiple Insertion von Transgenen	33
3.4.4 Merkmalsverlust im homozygoten Zustand des Transgens	38
3.5 INSTABILITÄT DURCH PHYSISCHEN VERLUST DER TRANSGEN-SEQUENZEN	40
3.6 INSTABILITÄT DURCH INTRACHROMOSOMALE REKOMBINATION UND MUTATION	44
3.7 INSTABILITÄT DURCH VERWENDUNG DES CAMV35S-PROMOTORS?	45
3.8 EINFLUSS DER TRANSFORMATIONSMETHODE AUF DIE EIGENSCHAFTEN DES TRANSGENEN LOCUS	47
3.9 EINFLUSS DES GENETISCHEN HINTERGRUNDES DES EMPFÄNGERORGANISMUS AUF DIE MERKMALSSTABILITÄT EINES TRANSGENS	49

3.9.1 Bedeutung phylogenetischer Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerorganismus	49
3.9.2 Genotypenabhängigkeit.....	51
3.10 ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHE EINFLÜSSE AUF DIE STABILITÄT	52
3.11 EINFLÜSSE DURCH UMWELTFAKTOREN	57
3.11.1 Abiotische Faktoren	57
3.11.2 Biotische Faktoren	63
3.12 ANGABEN ZUR HÄUFIGKEIT DES VERLUSTES TRANSGENER MERKMALE	65
4 TRANSGENE GEHÖLZPFLANZEN	69
4.1 MERKMALSSTABILITÄT IN TRANSGENEN GEHÖLZPFLANZEN	69
4.2 GEHÖLZPFLANZEN UND BIOLOGISCHES <i>CONFINEMENT</i>	73
5 FORSCHUNGSBEDARF	81
6 ZUSAMMENFASSUNG	83
7 SUMMARY	88
8 GLOSSAR	92
9 LITERATUR.....	99
10 ANHANG	115
10.1 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVEREICHNIS	115
10.2 QUELLEN UND LITERATURRECHERCHE	116
10.3 INTERNETADRESSEN.....	118
10.4 LITERATUR ZU TABELLE 6, TRANSFORMATION VON GEHÖLZPFLANZEN - ANWENDUNGSORIENTIERTE STUDIEN.....	119

VORBEMERKUNG

Die vorliegende Literaturstudie behandelt ein komplexes Thema, für dessen Beschreibung die Verwendung von Fachbegriffen aus der klassischen und der molekularen Genetik unumgänglich ist. Um den Textfluß nicht durch Erläuterungen zu unterbrechen, wurde ein umfangreiches Glossar beigelegt.

Das Thema (Trans-)Gen-Instabilität ist nicht nur komplex, sondern darüberhinaus auch in vielen Belangen noch unverstanden. Eine umfassende Betrachtung dieses Forschungsgebietes erfordert die Berücksichtigung einer Vielzahl mehr oder weniger detaillierter Phänomenbeschreibungen, spekulativer Interpretationen und Erklärungsmodelle. Die Verfasser dieser Studie möchten sich bei einer Reihe von Kollegen für Informationen und Ratschläge bedanken, die die Orientierung im Literatur-„Dschungel“ zu diesem Thema erleichtert haben: Dirk Becker, Inge Broer, Matthias Fladung, Martin Meixner, Florian Mette, Peter Meyer, Ortrun Mittelsten-Scheid, Holger Puchta, Steven Strauss und Kurt Zoglauer. Selbstverständlich liegt die Verantwortung für eventuelle Mißinterpretationen oder unkorrekte Darstellungen auf Seiten der Verfasser der Studie.

ABKÜRZUNGEN¹

5-Fluoro-dUMP	5-Fluoro-Deoxyuridin-Monophosphat
A1	codierende Sequenz der Dihydroflavonol-Reduktase aus <i>Zea mays</i>
<i>bar</i>	Herbizidresistenzgen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (bialaphos-resistance)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CO	chimäre Oligonucleotide
CP4	<i>Coat protein 4</i>
Cre-lox	<i>Cyclisation of recombination – Locus of crossing over</i>
<i>gdf</i>	Codierende Sequenz der Dihydroflavonol-Reduktase aus <i>Gerbera</i>
HDGS	<i>Homology dependent gene silencing</i>
<i>gfp</i>	codierende Sequenz des <i>Green Fluorescent Protein</i>
GOX	Glyphosat-Oxidoreduktase
GUS	β-Glucuronidase
<i>hpt</i>	codierende Sequenz der Hygromycin-Phosphotransferase
<i>nos</i>	codierende Sequenz der Nopalinsynthase
<i>nptII</i>	codierende Sequenz der Neomycin-Phosphotransferase II
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
PARP	polyADP-Ribose-Polymerase
<i>pat</i>	Herbizidresistenzgen aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Phosphinothricin-Acetyltransferase)
PTGS	<i>Posttranscriptional gene silencing</i>
<i>rbcS</i>	Codierende Sequenz der kleinen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
T-DNA	Transfer-DNA
TGS	<i>Transcriptional gene silencing</i>
UPOV	International Union for the Protection of New Varieties of Plants
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>

¹ Abkürzungen, die nur in den Tabellen der Kapitel 3 und 4 enthalten sind und dort erklärt werden, sind in dieser Liste nicht aufgeführt.

1 PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER LITERATURSTUDIE

Seit etwa 10000 Jahren züchtet der Mensch durch Auslese und Kreuzung neue, für landwirtschaftliche Zwecke optimierte und gegenüber ihren ursprünglichen Eigenschaften stark veränderte Formen bestimmter Pflanzenarten. Ermöglicht wurde diese Erweiterung der Formenvielfalt durch die hohe Variabilität und Flexibilität des pflanzlichen Genoms (Rekombinationen, chromosomale Umlagerungen, Mutationen, mobile Elemente) und durch die bei Pflanzen nicht seltene Vermischung und Kombination unterschiedlicher Genome nach natürlichen, art- und gattungsübergreifenden Hybridisierungen. Im letzten Jahrhundert wurde die Basis für die Auslese neuer Formen und Merkmale durch mutationsauslösende Chemikalien oder Strahlen sowie durch gezielte, von Züchtern vorgenommene interspezifische Kreuzungen noch gesteigert.

Nachdem ein Merkmal durch Auslese erfasst und züchterisch für interessant befunden wurde, soll es in seiner Ausprägung eine möglichst hohe Stabilität besitzen. Diese Stabilität muss aus folgenden Gründen in Versuchslinien zunächst ermittelt und anschließend auf Sortenebene durch kontinuierliche Maßnahmen erhalten werden:

- (i) Über die für das Merkmal verantwortliche(n) Gene bzw. Genaktivität liegen zunächst keine Informationen vor. Gene wirken niemals isoliert, ihre Wirkung wird durch den genetischen Hintergrund und die Umwelt (mit)bestimmt. Nur ein Bruchteil der Regulationsprozesse und Interaktionen zwischen genetischen Informationen, entwicklungspezifischen Faktoren sowie biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen sind bisher jedoch aufgeklärt.
- (ii) Durch Mutation erzeugte oder nach interspezifischen Kreuzungen vorkommende chromosomale Umlagerungen sind „zufällige“ und unkontrollierbare Integrationsereignisse, die von Sequenzumlagerungen begleitet werden und Einflüssen durch den veränderten genomischen Kontext unterliegen. Diese Faktoren können eine instabilisierende Wirkung ausüben.
- (iii) Einen niedrigfrequenten Beitrag zur Instabilität eines Merkmals liefert die oben erwähnte Variabilität des Genoms (die eine 100% Stabilität in biologischen Systemen ausschließt).
- (iv) Bei der Vermehrung von Linien und *Sorten* können Merkmalsverluste durch Saat-Beimischungen, Einkreuzungen von Nachbarmaterial oder aus der „Wildnis“ entstehen.

Seit etwa 1980 lassen sich Pflanzen durch Übertragung einzelner, definierter DNA-Sequenzen gentechnisch modifizieren. Diese Technik stellt eine grundlegende Neuerung gegenüber herkömmlichen Verfahren der Pflanzenzüchtung dar, da nun ein unbegrenzter Genpool für genetische Veränderungen zur Verfügung steht. Gentechnisch vermittelte Merkmale unterliegen

dabei den gleichen instabilisierenden Einflüssen wie konventionelle Merkmale, allerdings sind transgene Merkmale aus folgenden Gründen häufiger und in stärkerem Maße betroffen:

- Die gegenwärtig verfügbaren Transformationstechniken erlauben zum einen nur eine „zufällige“, nicht kontrollierbare Integration der fremden Gene in das Genom des Empfängerorganismus. Derartige Integrationsereignisse ähneln den oben unter (ii) erwähnten chromosomalen Umlagerungen. Die hieraus resultierenden Sequenzumordnungen und Positionseffekte sind systembedingt und führen dementsprechend häufig² zu Verlusten oder zu Veränderungen der Ausprägung transgener Merkmale.
- Zum anderen können die erst mit Hilfe gentechnischer Verfahren möglich gewordenen großen phylogenetischen Unterschiede zwischen Spender und Empfängerorganismen (z.B. die Expression bakterieller Gene in Pflanzen) aufgrund noch unbekannter Regulationsprozesse bzw. Interaktionen zwischen genetischen Informationen Schwierigkeiten hinsichtlich der Expressionsstabilität des Transgens auftreten.

Auf Sortenebene ist man aus wirtschaftlichen Motiven bestrebt, einen gewissen Stabilitätsgrad des erwünschten Merkmals einzuhalten. Als Gegenstand sicherheitsbezogener Erwägungen ist die Stabilität transgener Merkmale in Situationen zu betrachten, in denen der Verlust eines transgenen Merkmals eine direkte oder indirekte Umweltwirkung hervorrufen kann. Ein Beispiel hierfür stellen die Systeme zur Vermeidung der Ausbreitung von Transgenen über Samen oder Pollen dar, in denen die Entwicklung von Blüten oder Blütenorganen durch die Expression bestimmter Gene verhindert wird. Die Etablierung solcher biologischen *Confinements* wird in Zusammenhang mit der Freisetzung und Kommerzialisierung transgener Gehölzarten diskutiert. Viele Gehölzarten besitzen ein sehr hohes Reproduktions- und Ausbreitungspotential. Sie stellen sehr langlebige Organismen dar, im näheren Umkreis finden sich häufiger als bei krautigen Nutzpflanzen kreuzungskompatible Arten, und die Kombination aus Windbestäubung, großer Wuchshöhe und speziellen morphologischen Eigenschaften der Samen gewährleistet u.a. bei Waldbäumen eine weite Verbreitung sowohl des Pollens als auch der Nachkommen. Voraussetzung für die Wirkungssicherheit von biologischen *Confinements* ist eine hohe Merkmalsstabilität der Gene, deren Aktivität die Blütenbildung unterdrücken.

Das Ziel dieser Studie besteht darin, den derzeitigen Kenntnis- und Diskussionsstand zum Thema „Stabilität transgener Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen“ umfassend und übersichtlich zu dokumentieren. Transgene Gehölzpflanzen und die Wirkungsweise von Sterilitätsgenen zur Erzeugung von biologischen *Confinements* erfahren dabei besondere Berücksichtigung. Unter Einbeziehung der Daten und Schlüsse aus der Dokumentation wird der Forschungsbedarf zur Problematik der Instabilität transgener Merkmale im allgemeinen und in

² Diese Aussage bezieht sich auf Primärtransformanten, die noch keinem Ausleseverfahren hinsichtlich Expressionshöhe und –stabilität unterzogen wurden. Eine über mehrere Generationen überprüfte, gentechnisch veränderte Linie kann den gleichen Stabilitätsgrad aufweisen wie konventionelle Sorten.

Hinblick auf die Nutzung biologischer *Confinements* bei der Ausbringung transgener Gehölze formuliert. Die Studie soll eine Grundlage für die Erörterung der Fragestellung schaffen, welche Erwartungen und Ansprüche an ein solches *Confinement* in transgenen Gehölzbeständen gestellt werden können, wo die Grenzen einer solchen Maßnahme liegen und wie eine Minimierung der Risiken einer Reversion zu fertilen Formen zu erreichen ist.

2 EINLEITUNG

2.1 BEDEUTUNG DER GENTECHNIK IN LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT

Die Fortschritte in der pflanzlichen Gewebekultur und der Molekularbiologie sowie die Entdeckung und Aufklärung des natürlichen Gen-Übertragungsvektors *Agrobacterium tumefaciens* bildeten Anfang der 80er Jahre die Grundlage für die Entwicklung neuer Strategien in der Pflanzenzüchtung. In einer Technologie, mit deren Hilfe sich einzelne Gene in Pflanzen übertragen lassen, sah die konventionelle Züchtung eine Erweiterung ihres methodischen Repertoires.

Die anwendungsorientierte Züchtungsforschung richtete bis etwa Mitte der 90er Jahre ihr Hauptaugenmerk auf die Einführung zumeist bakterieller Gene zur Vermittlung von Eigenschaften wie die Resistenz gegen Insekten oder nicht-selektive Herbizide, sowie auf die Übertragung von Hüllproteingenen zur Erzeugung von Virusresistenzen. Ein Blick auf die Züchtungsprogramme der zweiten Hälfte der 90er Jahre und auf die gegenwärtigen Forschungsprojekte lassen eine wesentlich breiter gefächerte Palette von möglichen Nutzungen für die nächsten Jahre erkennen: neben Pilzresistenzen, einem verbesserten Nährwert von Samen und Früchten und einer veränderten Zusammensetzung sekundärer Inhaltsstoffe, gehören eine effizientere Nährstoffaufnahme, die Anpassung an Trockenheit und Salzgehalt des Bodens oder die Produktion von „nachwachsenden Rohstoffen“ (abbaubare Kunststoffe, modifizierte Öle und Kohlenhydrate) und pharmazeutischen Produkten (Impfstoffe, Antikörper, Hormone) zu den gegenwärtigen Zuchtzielen.

Nach den ersten experimentellen Freisetzungen 1987 wurden Mitte der 90er Jahre die ersten transgenen Sorten kommerzialisiert. Heute sind insgesamt etwa 60-70 gentechnisch veränderte *Events*³ für den Anbau in verschiedenen OECD-Ländern zugelassen. Als transgen-vermittelte Merkmale sind Herbizidtoleranzen am häufigsten vertreten, gefolgt von Insekten- und Virusresistenz. Die Anbauflächen mit transgenen Pflanzen wachsen weltweit stetig an, von 1.7 Millionen ha (1996) auf ca. 50 Millionen ha im Jahre 2001 – wobei zu berücksichtigen ist, dass sich 99% dieser Fläche in den Ländern USA, Argentinien, Kanada und China befinden. Die Entwicklung in Ländern wie Japan oder der EU, in denen aufgrund von Vorbehalten gegenüber der „grünen“ Gentechnik Kommerzialisierung und Anbau transgener Sorten in größerem Maßstab noch nicht stattgefunden haben, bleibt abzuwarten.

Auch im Obstbau und der Forstwirtschaft gibt es Bestrebungen, die Gentechnik zur Verbesserung verschiedener Arten zu nutzen (s. Tzfira *et al.* 1998). Dazu gehört z.B. die Reduktion des Ligningehaltes in Pappeln zur effizienteren und umweltschonenderen Verwertung in der Papierindustrie (Baucher *et al.* 1998), die Resistenz gegen pilzliche Pathogene im Weinbau (Yamamoto *et al.* 2000) oder der Erzeugung virusresistenter sowie

³ Gentechnisch veränderte Basislinien, die in bestehende Sorten eingekreuzt werden.

frühblühender Obstbäume (Scorza *et al.* 1998, Pena *et al.* 2001). Obwohl schon seit Anfang der 90iger Jahre viele Freisetzungsexperimente mit Gehölzarten stattgefunden haben (darunter Apfel, Rhododendron, Pappel, Kaffee, Fichte, Walnuss und Himbeeren), wurde bislang nur eine einzige Gehölzart in einem OECD-Land in den Verkehr gebracht (*Carica papaya* mit Resistenz gegen den Papaya-Ringspot-Virus, 1997/USA). Diese Verzögerung ist damit zu erklären, dass die experimentelle Phase bei transgenen Bäumen sowie die Sortenzulassung naturgemäß länger andauert als bei ein- oder zweijährigen Nutzpflanzen.

2.2 STABILITÄT TRANSGEN-VERMITTELTEN MERKMALE

Eine erfolgreiche Nutzung der Gentechnik in Landwirtschaft und Pflanzenzüchtung setzt eine ausreichende Stabilität der transgen-vermittelten Merkmale voraus. In der landwirtschaftlichen Praxis werden zur Beurteilung der Beständigkeit eines Merkmals die Richtlinien der UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Genf/Schweiz⁴) herangezogen. Sorten dürfen hiernach eine Abweichung von höchstens 2-4% (je nach Probengröße) aufweisen, ein Stabilitätsgrad, der von transgen-vermittelten Merkmalen offensichtlich erreicht wird, wie der weltweit praktizierte Anbau gentechnisch modifizierter Sorten erkennen lässt. Darüber hinaus zeigen auch wissenschaftliche Studien, dass transgene Linien mit einem Ausfall des untersuchten Merkmals zwischen 0,005% und 2% eine hohe Stabilität besitzen können (z.B. Conner *et al.* 1998).

Die Mehrheit der im Labor produzierten transgenen Linien zeigt jedoch ein instabiles Verhalten, d.h. weist unerwartete Änderungen in der Ausprägung des transgenen Merkmals auf. Linien mit hoher und stabiler Expression müssen aus dem Pool dieser Primärtransformanten durch Auslese ermittelt werden. Instabilitäten oder Änderungen im Expressionsverhalten werden durch eine Vielzahl verschiedener und in den wesentlichen Zügen noch nicht aufgeklärter Prozesse verursacht - dementsprechend vielfältig sind die jeweiligen Erscheinungsbilder. Sie stehen jedoch übereinstimmend mit der Tatsache in Verbindung, dass ein Transgen eine genetische Information darstellt, deren Kontext in unkontrollierter Weise verändert wurde. Derartige Ereignisse sind mit Translokationen, d.h. Umlagerungen und Austauschen von Chromosomen-Abschnitten vergleichbar, die in der konventionellen Züchtung bei einigen Pflanzenarten zur Übertragung von Merkmalen aus Wildarten in Zuchtlinien benutzt werden können. Instabilitäten in der Merkmalsausprägung in Translokationslinien sind normale Begleiterscheinungen dieser Methode, stabile Linien müssen durch Selektion ermittelt werden. Auch andere Beispiele für Instabilitäten und Abweichungen von der Mendelschen Aufspaltung sind aus der klassischen Genetik bekannt (s. z.B. Seyffert 1998). In Zusammenhang mit derartigen Vorkommnissen wurden in der klassischen Genetik u.a. die Begriffe Penetranz (Prozentsatz von Genotypen, die den charakteristischen Phänotyp ausbilden), Expressivität

⁴ <http://www.upov.int/>

(der Ausprägungsgrad), Paramutation (Brink 1956, vererbare, aber reversible Suppression von Allelen) und Epimutation (Jeggo und Holliday 1986, Änderungen der Genexpression ohne Veränderungen der DNA-Sequenz) geprägt. Instabile Eigenschaften sind keine Folge gentechnischer Verfahren. Dass transgene Merkmale inzwischen weitaus häufiger als natürliche Eigenschaften in Studien zur Genstabilität untersucht werden, lässt sich auf die Tatsache zurückführen, dass hier die entsprechenden DNA-Sequenzen, ihre Funktion und bei codierenden Bereichen deren Produkte auf Proteinebene bekannt und deshalb einer hinreichenden Analyse überhaupt erst zugänglich sind.

Unerwartete Änderungen oder Verluste der Ausprägung transgener Merkmale haben die „grüne“ Gentechnik stets begleitet. „*Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti-plasmid of Agrobacterium tumefaciens*“ lautete der Titel der Publikation, in der 1981 erstmalig die Herstellung und Charakterisierung einer genetisch manipulierten Pflanze sowie die stabile Vererbung des übertragenen Gens in die Nachkommenschaft beschrieben wurde (Otten *et al.* 1981). Im gleichen Jahr publizierten Wullems *et al.* (1981) eine ähnliche Studie, in der ebenfalls die Nachkommenschaft eines mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformierten Tabaksprosses⁵ untersucht wurde. Im Unterschied zur Arbeit von Otten *et al.* (1981) berichteten Wullems *et al.*, dass nur ein Bruchteil der (nach den Mendelschen Regeln) erwarteten Zahl gentechnisch veränderter Nachkommen die Expression des Transgens zeigten. Ähnliche Abweichungen von der Mendelschen Aufspaltung bzw. der Verlust des transgenen Merkmals wurden in den folgenden Jahren mehrfach beschrieben. Insgesamt blieben solche Berichte jedoch bis etwa 1990 eher selten, obwohl aus heutiger Sicht der Anteil instabiler Linien unter den Primärtransformanten überwiegt. Gerade in den ersten Jahren dieser Technik galt eine nicht-Mendelnde Nachkommenschaft als fehlgeschlagenes Transformationsexperiment und es ist anzunehmen, dass viele solcher Daten überwiegend unveröffentlicht blieben.

Die Berichte lassen sich in zwei Gruppen teilen: eine (sehr viel kleinere) Gruppe beschreibt Ereignisse, in denen der Verlust des transgenen Merkmals auf den Verlust oder Änderungen der DNA-Sequenz selbst zurückgeführt wird, während die Publikationen der zweiten, weitaus größeren Gruppe über Merkmalsverluste bei unveränderter Transgen-Sequenz berichten.

In der folgenden Übersicht wurde nur eine kleine Auswahl von Publikationen berücksichtigt. Die zitierten Arbeiten haben in der Regel erstmalig bestimmte Phänomene beschrieben oder wichtige Daten und Erkenntnisse zum Thema beigetragen.

2.2.1 Verlust des transgenen Merkmals durch Sequenzverlust oder –änderung

Merkmalsverluste von Transgenen durch physischen Verlust der entsprechenden Sequenzen (Deletionen) oder durch Umordnungen im bereits integrierten Sequenzbereich wurden nur selten beschrieben. Solche Ereignisse fand man in transgenen Zellkulturen (z.B. Peerbolte *et*

⁵ Die Art *Nicotiana tabacum* wurde aufgrund des gut entwickelten Gewebekultur-Systems und der relativ leichten genetischen Manipulierbarkeit sehr schnell zur Modellpflanze in diesem Forschungsgebiet.

al. 1987), aber auch in intakten Pflanzen (z.B. Spencer *et al.* 1992). Ob die geringe Zahl von Berichten hierüber tatsächlich auch eine insgesamt geringe Frequenz solcher Vorkommnisse widerspiegelt, ist unklar, da in den wenigen Untersuchungen hierzu jeweils ein relativ hoher Prozentsatz von Linien einen Verlust des (in den ersten Generationen nachweisbaren) transgenen Merkmals aufwies (s. Abschnitt 3.5). Verlust oder Änderungen der Basensequenz durch Mutationen oder intrachromosomale Rekombinationen (Abschnitt 3.6), die mit einer im Vergleich hierzu sehr viel niedrigeren Frequenz von etwa $10^{-4} - 10^{-7}$ auftreten, können in diesen Fällen ausgeschlossen werden.

2.2.2 Verlust des transgenen Merkmals bei unveränderter Basensequenz

Barton *et al.* (1983) wiesen nach, dass im Fall der von ihnen produzierten transformierten Tabaklinien eine von den Mendelschen Regeln abweichende Aufspaltung nur phänotypisch (auf Expressionsebene), nicht aber genotypisch vorlag. Die Transgene waren in unveränderter Form an die Nachkommen weitergegeben worden, befanden sich jedoch in einem inaktiven Zustand. In den folgenden Jahren häuften sich Beispiele, in denen gleichfalls das intakte Gen, jedoch nicht dessen Expression nachzuweisen war (z.B. Czernilofsky *et al.* 1986, Potrykus *et al.* 1985, Sukhapinda *et al.* 1987).

Die Inaktivierung von Genen durch eine Modifikation der DNA war schon damals kein unbekanntes Phänomen. In Kenntnis der bereits in der Virusforschung und Säugerbiologie diskutierten Rolle der Cytosin-Methylierung als Signal für Gen-Suppressionen (Dörfler 1981) zeigten Hepburn *et al.* (1983) erstmals, dass auch in Pflanzen ein Zusammenhang zwischen Methylierung und (In-)Aktivität eines durch *Agrobacterium tumefaciens* übertragenen Gens bestehen kann. In Untersuchungen an *Agrobacterium*-induzierten Tumoren, die ein inaktives Nopalinsynthase-Gen (*nos*) besaßen, fanden Hepburn *et al.*, dass die Demethylierung der entsprechenden Sequenz durch Behandlung der Zellen mit Azacytidin (ein Inhibitor des Enzyms Methyltransferase, welches die Methylierung des Cytosins katalysiert) mit einer Aktivierung des *nos*-Gens verbunden war.

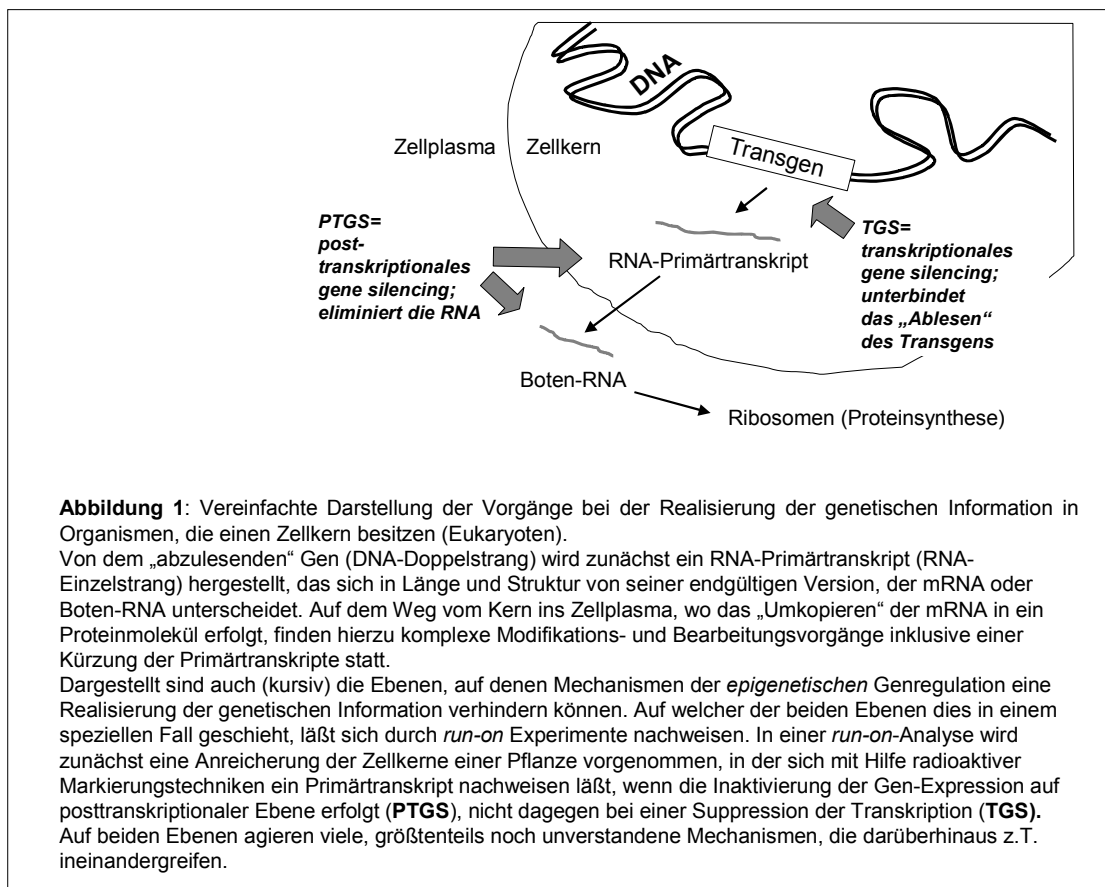
Die Ergebnisse einer Untersuchung von Matzke *et al.* (1989) deuteten schließlich daraufhin, dass Methylierung und Sequenzhomologien mit der Inaktivierung von Transgenen in Zusammenhang stehen können. In zwei aufeinanderfolgenden Transformationsschritten wurden Doppeltransformanten erzeugt, die verschiedene Markergene unter Kontrolle des gleichen Promotors (*nos*-Promotor) enthielten. Während nach der ersten Transformation eine normale Expression festgestellt wurde, waren die Gene in 15% der Doppeltransformanten „abgeschaltet“. Der inaktive Zustand der Gene war mit einem hohen Methylierungsgrad des Promotorbereichs korreliert. Nach einer Trennung der transgenen Loci durch Aufspaltung in der Nachkommenschaft wurde eine Reaktivierung der Transgene, inklusive einer Verringerung des Methylierungsgrades der Promotoren, beobachtet.

Zur gleichen Zeit wurde in zwei Arbeitsgruppen der Versuch unternommen, Petunien mit einer intensiveren Blütenfarbe durch Überexpression der Chalconsynthase, einem Schlüssel-Enzym aus der Synthese der Anthocyan-Farbstoffe, zu erzeugen. Hierzu wurde das bereits bekannte Gen der Chalconsynthase mit einem starken Promotor (CaMV-35S) versehen und in Petunien übertragen. Unerwarteterweise besaßen einige (ca. 25%) Transformanten weisse oder lila-weiss gemusterte Blüten. In diesen Linien waren sowohl das neu eingefügte Transgen als auch das endogene Chalconsynthase inaktiviert worden (Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990). Den gleichen Effekt fanden Smith *et al.* (1990) in transgenen Tomatenpflanzen, in die ein Polygalacturonidase-Gen (ein in der Tomate bereits existierendes Gen, dessen Aktivität im Fruchtreifeprozess eine wichtige Rolle spielt) übertragen worden war.

Pflanzeigene Gene ließen sich mit Hilfe dieses als *Sense*- oder Co-Suppression bezeichneten Vorganges „abschalten“. Die Inaktivierung war hier ebenfalls mit einer Methylierung der entsprechenden Sequenzen verbunden. Einige Jahre zuvor hatte man bereits eine ähnliche Vorgehensweise zur „Down-Regulation“ von natürlichen Genen mit Erfolg bei Pflanzen einsetzen können. Bei dieser Strategie wurden die entsprechenden Sequenzen in umgekehrter Orientierung (*Antisense*⁶) in die Pflanzen transformiert (van der Krol *et al.* 1988). Allerdings zeigte, wie bei der Co-Suppression, auch hier nur ein Bruchteil der Transformanten die gewünschte Inhibierung der Expression der endogenen Sequenz, während der größte Teil der Linien keinerlei Veränderungen aufwies. Warum ein Transgen sowohl als *Sense* als auch als *Antisense*-Kopie ein homologes, pflanzeigenes Gene „abzuschalten“ vermag und warum dies nur bei bestimmten Linien erfolgt, klärt sich erst jetzt auf (Wang und Waterhouse 2000, s. Abschnitt 3.4.3).

Wichtige Erkenntnisse lieferten Untersuchungen zur Co-Suppression hinsichtlich der molekulargenetischen Ebene, auf der eine Gen-Inaktivierung erfolgen kann. In den Arbeiten von Mol *et al.* (1991) und de Carvalho *et al.* (1992) konnte mit Hilfe von *run-on* Experimenten zwischen einer Inaktivierung auf *transkriptionaler* oder auf *posttranskriptionaler* Ebene unterschieden werden (Abbildung 1). Bei einer *run-on*-Transkription wird eine Anreicherung der Zellkerne vorgenommen, in der sich mit Hilfe radioaktiver Markierungstechniken ein Primärtranskript nachweisen läßt, wenn die Inaktivierung der Gen-Expression auf posttranskriptionaler Ebene erfolgt, nicht dagegen bei einer Suppression der Transkription. Co-supprimierte Linien wiesen eine normale Transkriptionsaktivität auf, d.h. die Inaktivierung muss mit einer posttranskriptionalen Degradierung der RNA in Verbindung stehen. Die von Matzke *et al.* (1989) beschriebene Gen-Inaktivierung nach Kombination mehrerer Kopien des *nos*-Promotors in Doppeltransformanten fand hingegen auf transkriptionaler Ebene statt (Matzke *et al.* 1993). Hieraus wurde geschlossen, dass es für die mit der Existenz homologer Sequenzen in Zusammenhang stehende Inaktivierung unterschiedliche Mechanismen geben muss.

⁶ In diese Kategorie gehört z.B. die in den USA kommerzialisierte „Antimatsch“-Tomate, die aufgrund der (*Antisense*)Inaktivierung eines pflanzeigenen Galacturonidasegens eine verzögerte Reifung aufweist



In der Arbeit von van der Krol (1990) findet sich erstmalig der Begriff *gene silencing* für diese Phänomene, ein Begriff, der schon vorher in der Systematik für den Expressionsverlust bestimmter Allele nach Kreuzungen phylogenetisch entfernter Arten benutzt wurde.

Eine anschauliche Demonstration für die Instabilität der Merkmalsausprägung eines Transgens lieferte das erste Freisetzungsexperiment in Deutschland. Für diesen Versuch, dessen eigentliches Ziel darin bestand, ein „springendes Gen“ zu identifizieren (s. Abschnitt 3.11.1), wurden im Sommer 1990 31000 Individuen einer transgenen Petunien-Linie ausgebracht. Die Pflanzen enthielten eine einzelne Kopie eines Mais-Gens, dessen Aktivität unter Gewächshausbedingungen eine für Petunien bis dahin untypische lachsrote Blütenfarbe verursachte. Die Erwartung der Wissenschaftler, dass eine geringe Zahl von Individuen aufgrund der Aktivität springender Gene zur weissblühenden Form revertiert, bestätigte sich nicht. Stattdessen zeigten unter Feilandbedingungen je nach Beobachtungszeitpunkt (Juni-August) bis zu 60% der Pflanzen einen mehr oder weniger starken Verlust der lachsroten Blütenfarbe. Molekularbiologische Analysen ergaben, dass das Mais-Gen in diesen Pflanzen hypermethyliert war (Meyer *et al.* 1992). Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur *Sequenzhomologien* mit dem Verlust des transgenen Merkmals in Verbindung stehen können, sondern auch als Einzelkopie integrierte Transgene durch *Umweltfaktoren* in ihrer Stabilität beeinflusst werden können.

Die Untersuchung des Methylierungsmusters entwickelte sich in den folgenden Jahren zu dem am häufigsten untersuchten Aspekt in Studien zur Transgen-Stabilität, sicherlich nicht zuletzt aufgrund der Verfügbarkeit verschiedener und z.T. relativ einfach durchzuführender Techniken. Dass allerdings die Feststellung einer Korrelation nichts über Ursache und Wirkung aussagt, bemerkte Jorgensen schon 1991. Ausnahmen gab es schon Anfang der 90er Jahre genug: das Genom einiger Insekten, Pilze oder Würmer weist (fast) keine Methylierung auf, eine Reihe von Paramutations-Phänomenen zeigt keine Korrelation zu Methylierungen und hochmethylierte Gene können durchaus aktiv sein, während nicht-methylierte Gene inaktiv sind. So ist sowohl die Rolle der Cytosin-Methylierung als auch die Bedeutung der Sequenzhomologie bei der (Trans-)Gen-Inaktivierung auch 18 Jahre nach Veröffentlichung der Untersuchung von Hepburn *et al.* 1983 nicht abschließend geklärt (Paszkowsky und Whitham 2001).

Vorgänge, die Änderungen der Expression eines Gens bewirken, ohne dass Veränderungen der DNA-Sequenzinformation (wie bei Mutationen und Rekombinationsereignissen) stattgefunden haben, werden den *epigenetischen Regulationsprozessen* zugeordnet. Die Regulation der Genexpression findet in diesem Fall auf einer oberhalb der DNA-Sequenzinformation liegenden Ebene statt und erfolgt durch die DNA-Modifikation durch Cytosin-Methylierung sowie durch *Chromatin-remodelling* bzw. Änderungen der molekularen Architektur des Chromatins, die Einfluss auf die Aktivität spezifischer Gene haben können (Meyer 2000). Methylierungsmuster und Chromatinstruktur sind durch Interaktionen zwischen genetischen Faktoren sowie durch Umweltfaktoren beeinflussbar und können an Tochterzellen und an die Nachkommenschaft weitergegeben werden. Verschiedene Vorgänge, die der epigenetischen Genregulation zugeordnet werden, sind bereits seit längerem bekannt. Hierzu gehört z.B. das genomische Imprinting, ein Begriff, der die Vererbung eines inaktiven oder eines aktivierbaren Zustandes von Genen mütterlicherseits oder väterlicherseits an die nächste Generation beschreibt. Auch die Paramutation und Transvektion beruhen auf epigenetischen Prozessen (s. z.B. Wolffe und Matzke 1999).

Die grundlegenden Mechanismen der epigenetischen Genregulation sind allerdings noch weitgehend unverstanden. Durch die oben geschilderten Untersuchungen zur Co-Suppression und zur Korrelation zwischen *gene-silencing* und Methylierung entwickelten sich die Arten *Petunia hybrida* und *Nicotiana tabacum* (ab etwa 1994 auch *Arabidopsis thaliana*) zu den bevorzugten Modellorganismen in diesem Gebiet. Die Ergebnisse der Untersuchungen an diesen Arten zeigten bereits, dass für die Inaktivierung eines (Trans)gens eine ganze Reihe unterschiedlicher Prozesse verantwortlich sein können (Matzke und Matzke 1995, Fagard and Vaucheret 2000a). Man hat während der letzten Jahre versucht, eine (eher deskriptive) Systematik des *gene silencing* in Pflanzen vorzunehmen. Es wurden jedoch immer wieder neue Varianten beschrieben, die von keinem Modell hinreichend erklärt wurden (z.B. Fu *et al.* 2000). Einige Kommentare zum *gene silencing* mögen die aktuelle Situation belegen: "...we do not have enough information to understand the mechanisms of gene silencing in plants" (Fagard

und Vaucheret 2000a) und “...*the reason why some transgenes become silenced...while others do not remains a mystery*” (Grant 1999) oder “*Unfortunately confusion often follows discovery of novel biological phenomena, and in the area of gene-silencing, the confusion is still formidable.*” (Selker 1999). Die Ähnlichkeit zur Äußerung von Jorgensen (1991) ist frappant: “*Understanding of the mechanism behind (repeat-induced) gene-silencing is not yet near.*”

Allerdings wurden im Verlauf der letzten 3 - 4 Jahre auf diesem Gebiet auch einige Fortschritte erzielt, z.B. bei der Isolierung und Charakterisierung der am *gene silencing* beteiligten Gene (Fagard *et al.* 2000, Mourrain *et al.* 2000), bei der Aufklärung von RNA/RNA-Interaktionen und des RNA-Abbaus (Baulcombe 2000, Tuschl *et al.* 1999) sowie der Klärung von DNA-DNA Interaktionen (Selker 1999). Da das Phänomen der Gen-Inaktivierung oder der Geninstabilität weder auf Pflanzen noch auf Transgene beschränkt ist, sind für diesen Fortschritt auch die Erkenntnisse aus der Tumorbilogie, der Embryologie oder der Evolutionsbiologie mitverantwortlich. Daher ist auch seit wenigen Jahren ein Übergang von einer eher deskriptiven zu einer konstruktiven oder kreativen Modellentwicklung zu beobachten. Neben der Frage nach dem „Wie“ und „Wann“, stehen daher häufig auch Fragen nach dem „Warum“ und dem biologischen Sinn im Vordergrund. So wird das *gene silencing* in Pflanzen (aber nicht nur in Pflanzen) seit einiger Zeit im Zusammenhang mit dem Konzept eines Abwehrsystems gegenüber der Aufnahme und Integration fremder Nukleinsäuren (*intrusive DNA* bei Kumpatla *et al.* 1998 oder *invasive DNA* bei Matzke *et al.* 1996, Matzke und Matzke 1998) diskutiert. Solche Abwehrsysteme wurden sowohl von pro- als auch eukaryotischen Zellen entwickelt. Zu den „eingedrungenen“ Nukleinsäuren werden z.B. (Para-) Retro-Viren, Viroide, aber auch endogene, (latent) mobile, eigenständige oder „kryptische“ DNA-Sequenzen sowie Transgene gezählt. Aber auch für die passive Entwicklung neuer Arten (und die Entstehung von Reproduktionsbarrieren) könnte das *gene silencing* mitverantwortlich sein (Lynch und Conery 2000).

Die meisten Phänomene, die in Zusammenhang mit der Instabilität transgener Merkmale bei Pflanzen beschrieben wurden, stehen mit epigenetischen Prozessen in Verbindung. Über einen vollständigen Verlust von Transgenen wurde, wie oben schon erwähnt, weitaus seltener berichtet. Es existieren darüber hinaus Fälle von Merkmalsinstabilitäten, die keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden können. Hierzu gehört z.B. die Temperatursensitivität der Expression des *pat41*-Gens, der natürlichen codierenden Sequenz der Phosphinothricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces viridochromogenes*, die eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Basta vermittelt (Walter *et al.* 1992, Köhne *et al.* 1998, s. hierzu die Abschnitte 3.9 und 3.11.1).

2.3 URSACHEN DER INSTABILITÄT TRANSGENER MERKMALE

Die Ursachen und Faktoren, die den Stabilitätsgrad eines transgenen Merkmals mit unterschiedlicher Gewichtung gemeinsam bestimmen, lassen sich in drei Kategorien einteilen (s. auch Abbildung 2).

2.3.1 „Zufällige“ Integration und Sequenzhomologien

Die Übertragung und die Integration fremder Sequenzen in Pflanzenzellen wird in hohem Maße von „zufälligen“ Ereignissen auf molekularer Ebene begleitet. Dies betrifft zum einen die Struktur des transgenen Locus, der durch vielfältige Sequenzumlagerungen während des Transformationsprozesses einen hohen Komplexitätsgrad aufweisen kann, zum anderen dessen Position im Genom der Wirtspflanze, da der Einbau in einer nicht zu kontrollierenden Weise an einem nicht bestimmbar Ort erfolgt. Ein solch „zufällig“ entstandener Locus unterliegt dem Einfluss verschiedener und in der Mehrheit bislang unverstandener *epigenetischer* Regulationsmechanismen, die die Aktivität der übertragenen Gene bestimmen, ohne dass diese eliminiert oder auf Sequenzebene verändert werden. Bildlich ausgedrückt: der transgene Locus befindet sich in einem Netzwerk eines komplizierten Informationssystems auf Nukleinsäure/Protein-Basis, das offensichtlich Kontrollmechanismen besitzt, solche komplexen und/oder in einem nicht „passenden“ genetischen Kontext befindlichen Loci zu erkennen und diese zu irgendeinem Zeitpunkt „abzuschalten“ (Matzke *et al.* 1998, Kumpatla *et al.* 1998).

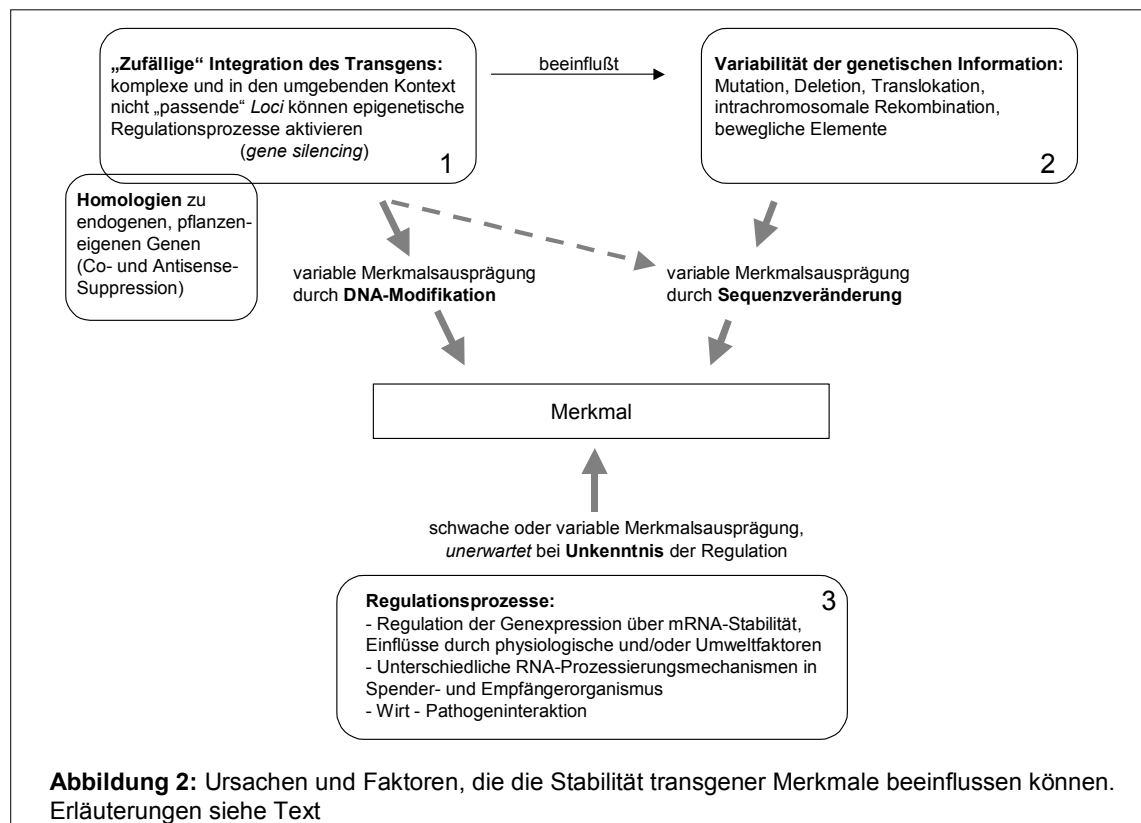
Da in diesem Erkennungsprozess u.a. *homologe* Sequenzbereiche eine Signalfunktion besitzen und gleichzeitig auch das Ziel von Kontrollmaßnahmen darstellen, können (i) sowohl endogene, pflanzeigene Gene inaktiviert werden, wenn eine entsprechende homologe Sequenz als Transgen übertragen wurde, als auch (ii) transgene Sequenzen selbst einer Inaktivierung unterliegen, wenn sie durch wiederholte Transformationsschritte oder durch Kreuzung transgener Linien mehrfach in einem Genom vorliegen.

Dieser als Co-Suppression (oder *Antisense*-Suppression, wenn die transgene Sequenz eine umgekehrte Orientierung aufweist) bezeichnete Effekt wird in der Gentechnik zum „Ausschalten“ natürlicher Gene verwendet. Im Prinzip handelt es sich hierbei um einen starken *gene silencing* Effekt auf transkriptionaler oder posttranskriptionaler Ebene (s. Abbildung 1). Diese gezielte Gen-Inaktivierung hat wichtige Beiträge zum Verständnis der Phänomene des (unerwünschten) *gene silencing* geliefert. Die Co-Suppression kann aber auch selbst inaktiviert werden (Marathe *et al.* 2000, s. Abschnitt 3.11.2).

Die weitaus meisten Fälle von Instabilitäten transgener Merkmale beruhen, wie in Abschnitt 2.2 bereits erwähnt, auf Mechanismen des epigenetischen *gene silencing*, verursacht durch Positionseffekte, durch die Komplexität des transgenen Locus oder durch Homologieeffekte. In den wenigen Publikationen, in denen der Verlust eines Merkmals auf den Verlust des

Transgens selbst zurückgeführt wird, wird zumeist ebenfalls ein Zusammenhang mit dem Integrationsort vermutet (unterbrochener Pfeil in Abbildung 2). Es ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Integrations-Strukturen oder bestimmte Loci auch eine physische Instabilität aufweisen können (s. Abschnitt 3.5).

Die Merkmalsinstabilitäten dieser Kategorie repräsentieren individuelle Eigenschaften einzelner Linien. Aus einer Population transgener Pflanzen lassen sich daher stabile Linien durch geeignete Ausleseverfahren ermitteln.



2.3.2 Genetische Variabilität

Die genetische Information repräsentiert keine starre, lineare Anordnung von Bauanleitungen für RNA- und Proteinmoleküle. Für ständige Änderungen der Information sorgt die Variabilität des Genoms, die auf der Aktivität mobiler Elemente (springende Gene), auf vielfältigen intrachromosomalen Umlagerungen und Deletionen von Sequenzen sowie auf Mutationen beruht (s. z.B. Walbot und Cullis 1985). Diese Variabilität, deren Ausmaß durch Umweltbedingungen beeinflusst wird, erzeugt eine Art niedrigfrequentes „Grundrauschen“ an Instabilität, dem transgene Sequenzen in gleicher Weise ausgesetzt sind. Sowohl die Mutationsrate (Kovalchuk *et al.* 2000) als auch die Frequenz intrachromosomaler

Rekombinationen (Assaad und Signer 1992, Puchta *et al.* 1995) in einem transgenen Locus kann in unabhängigen Linien unterschiedlich ausgeprägt sein, d.h. durch den Integrationsort offensichtlich beeinflusst wird. Der unter (1) beschriebene Positionseffekt ist also auch in diesem Zusammenhang wirksam.

Solche niedrigfrequenten Ereignisse (10^{-4} – 10^{-7}) wurden bislang nicht in Zusammenhang mit der Stabilität transgener Merkmale untersucht und nur selten diskutiert. Da in der vorliegenden Studie die Merkmalsstabilität u.a. auch unter sicherheitsbezogenen Aspekten in Zusammenhang mit biologischen *Confinements* erörtert wird, werden diese niedrigfrequenten Veränderungen jedoch ebenfalls in die Betrachtungen miteinbezogen (s. Abschnitt 3.6).

2.3.3 Unbekannte Regulationsprozesse und Gen-Interaktionen

Als *Instabilität* werden darüber hinaus aber auch Ereignisse gewertet, die aufgrund von noch unverstandenen Regulationsprozessen auf genomischer Ebene und Interaktionen zwischen genetischer Information,entwicklungsspezifischen Faktoren sowie biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen aus Sicht des Beobachters „unerwartet“ eintreten. Hierzu gehören z.B. die Merkmalsausprägung negativ beeinflussenden Interaktionen zwischen Viren und in der Wirtspflanze befindlichen Transgenen (Suppression der Co-Suppression, s. Abschnitt 3.11.2) oder Beispiele, in denen die betreffende Sequenz selbst die Eigenschaft besitzt, unter bestimmten physiologischen oder Umwelt-Bedingungen mit einer Änderung des Expressionsverhaltens zu reagieren. Auch werden Fälle, in denen es aufgrund großer phylogenetischer Unterschiede zwischen Spender- und dem Empfängerorganismus zu Problemen bei der Expression eines Gens kommt, in diese Kategorie eingeordnet, etwa die Expressionsinstabilität eines Gens monokotylen Ursprungs nach Übertragung in dikotyle Petunien (Elomaa *et al.* 1995) oder die schwache Expression bakterieller Gene in Pflanzen, z.B. die *cry*⁷-Toxingene aus *Bacillus thuringiensis* (s. Abschnitt 3.9). In diesem Bereich existiert allerdings eine gewisse „Grauzone“, da es vom Aufklärungsgrad des Vorganges abhängt, ob von einer Merkmalsinstabilität oder einem Regulationsprozess gesprochen wird.

Im Unterschied zu den unter (1) und (2) beschriebenen Ursachen, die eine Folge stochastischer (d.h. zufällig im statistischen Sinne) Ereignisse auf molekularer Ebene darstellen, sind die der Kategorie (3) zugeordneten Vorgänge unter Umständen kontrollierbar, wenn die zugrundeliegenden Regulationsvorgänge aufgeklärt wurden und geeignete Maßnahmen zur Erhöhung der Stabilität entwickelt werden konnten. Merkmalsverluste durch genetische Veränderungen der Kategorie 2 sind hingegen unvermeidbar. Bis zu einem gewissen Grad kontrollierbar sind Merkmalsinstabilitäten der Kategorie 1 durch geeignete Ausleseverfahren.

⁷ von *crystal*-protein; die Bt-Toxine bilden kristallförmige Aggregate

2.4 BEDEUTUNG DER INSTABILITÄT TRANSGENER MERKMALE FÜR DIE ANWENDUNG DER „GRÜNEN“ GENTECHNIK

2.4.1 Wirtschaftliche Aspekte

Auf die Richtlinien der UPOV bezüglich der Anforderungen an die Stabilität eines Merkmals zur Sortenzulassung wurde bereits hingewiesen. Um die Beständigkeit einer Sorte zu gewährleisten, wird in der konventionellen Pflanzenzüchtung und Saatgutproduktion eine Erhaltungszüchtung betrieben. Saat-Beimischungen, Einkreuzungen von Nachbarnfeldern oder aus der „Wildnis“, natürliche Instabilitäten wie Deletionen, Mutationen sorgen dafür, dass auch natürliche Merkmale keine absolute Stabilität besitzen. Transgene Sorten unterscheiden sich hierin nicht von konventionellen Sorten. Bei einer Häufung instabiler Individuen durch einen unerwarteten Merkmalsausfall in einer transgenen Sorte wären wirtschaftliche Nachteile für die betreffenden Saatzuchtfirmen zu erwarten. Von den Unternehmen sind hierzu allerdings aus naheliegenden Gründen wenig Auskünfte zu erhalten. Offiziell existieren keine Probleme mit Instabilitäten transgener Merkmale auf Sortenebene (Informationen von Mitarbeitern bzw. Öffentlichkeitsstellen der Firmen Aventis und Monsanto Deutschland). Die offizielle Stellungnahme von Monsanto Deutschland enthält den Hinweis *„commercial experience with our products has confirmed that the traits are stable“*.

Unter einem wirtschaftlichen Aspekt lassen sich auch die technischen Probleme betrachten, die aufgrund der Instabilität transgener Merkmale für solche Nutzpflanzenarten entstehen, die sich schwer transformieren lassen. Hierzu gehören z.B. viele Getreidearten, die gleichzeitig eine ökonomisch wichtige Bedeutung in der landwirtschaftlichen Produktion besitzen. Die niedrige Effektivität der gegenwärtig verwendbaren Transformationsmethoden für diese Arten erzeugen nur kleine Populationen transgener Linien, die sich für die oben erwähnten Ausleseverfahren nur bedingt eignen. In diesem Bereich gibt es erhebliche Anstrengungen, die Methoden zu verbessern und den Anteil stabiler Linien durch verschiedene Maßnahmen zu erhöhen.

2.4.2 Ökologische Aspekte

Es sind Szenarien vorstellbar, in denen die Instabilität eines Transgens in einer Nutzpflanze eine direkte oder indirekte Umweltwirkung hervorrufen kann. Werden z.B. durch Einführung von Genen Eingriffe in den Sekundärmetabolismus vorgenommen bzw. Stoffwechselwege verändert, stellt sich die Frage nach möglichen Zwischenprodukten, die beim „Ausfall“ endogener oder rekombinanter Gene auftreten können und welche Wirkung diese haben können.

Ein weiteres Beispiel stellen die Systeme zur Vermeidung der Ausbreitung von Transgenen über Samen oder Pollen dar, in denen die Blütenentwicklung durch die Expression bestimmter Gene verhindert wird (s. Kapitel 4). Für die Wirkungssicherheit solcher biologischen *Confinements* ist eine sehr hohe Merkmalsstabilität offensichtlich. Die Instabilität von

Transgenen in gentechnisch modifizierten Nutzpflanzen ist deshalb unter Umständen durchaus sicherheitsrelevant.

Die letzten Beispiele machen deutlich, dass die Instabilität transgener Merkmale aus unterschiedlichen Blickwinkeln betrachtet werden muss. Eine Frequenz von höchstens 2% Merkmals-Abweichlern, wie von der UPOV (s. Seite 5) für die Sortenzulassung gefordert, mag z.B. für herbizidtolerante Linien wirtschaftlich akzeptabel sein, für ein biologisches *Confinement* aus Sicherheitserwägungen dagegen nicht. Zu berücksichtigen sind auch weitere Aspekte, etwa die biologischen Eigenschaften des Ziel-Organismus (s. Kapitel 6) oder die Tatsache, dass die Aktivität von Transgenen durch zunächst nicht beachtete Faktoren beeinflusst werden kann (z.B. Inaktivierung durch Virusbefall, 3.11.2). Das Problem lässt sich deshalb nicht allein durch entsprechende Ausleseverfahren lösen. Erforderlich sind gleichzeitig begleitende Forschungsaktivitäten auf verschiedenen Ebenen, um den Kenntnisstand zur Stabilität der Merkmalsausprägung von Transgenen zu erweitern.

3 DOKUMENTATION

3.1 ANMERKUNGEN ZUR RELEVANTEN LITERATUR

Eine Sichtung der relevanten Literatur zur Stabilität transgener Merkmale vermittelt ein sehr heterogenes Bild. Die Publikationen, die für diese Dokumentation herangezogen wurden, lassen sich grob in vier Gruppen einteilen:

1. Publikationen von Arbeitsgruppen, die sich mit den dem *gene silencing* zugrundeliegenden Mechanismen beschäftigen, in der Regel sehr genaue molekulargenetische Analysen der transgenen Loci vornehmen, entsprechende Untersuchungen zur Transkription der relevanten Gene durchführen, und z.T. aus den Ergebnissen Modelle zur Gen-Inaktivierung ableiten. Mehr als die Anwendung der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung stehen hier die Mechanismen der epigenetischen Genregulation und ihre grundlegenden biologischen Funktionen im Mittelpunkt. Auf die Bedeutung dieser Forschungsrichtung wurde bereits im vorigen Kapitel hingewiesen. In diesen Arbeiten werden häufig Linien untersucht, in denen durch Einbringung speziell konstruierter Gen-Kassetten eine Transgen-Inaktivierung gezielt induziert wird. Insofern stellen diese Linien aus der Sicht derjenigen, die eine Transgen-Inaktivierung als „Unfall“ betrachten, eher Modelle dar. Allerdings enthalten diese Publikationen wichtige Informationen zu den Charakteristika transgener Loci, die zur Instabilität neigen. In diesen Studien dienen fast ausnahmslos Modellpflanzen als Untersuchungsobjekte, daher existiert eine Fülle an Informationen zur Transgen-Instabilität für die Arten *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*.

2. Publikationen von Arbeitsgruppen, die sich weniger mit dem Problem der Instabilität von Transgenen auseinandersetzen, sondern die Nutzung einer Form der epigenetischen Regulation, des *homology dependent gene silencing* (HDGS), zur Co-Suppression endogener, pflanzeneigener Gene oder viraler Sequenzen zur Erzeugung von Virus-Resistenzen zum Ziel haben. Da auch hier eine Inaktivierung gezielt induziert wird, handelt es sich auch bei den in diesen Untersuchungen produzierten Linien um Modelle, die eine stabile Inaktivierung der betreffende Gene zeigen (und somit ebenfalls Informationen zu *silencing*-anfälligen Locus-Strukturen liefern). Die vorliegende Studie enthält jedoch keine ausführliche Übersicht zum Thema Co-Suppression, sondern bezieht nur eine Auswahl von Publikationen mit ein, die für das Thema *Locus-Struktur* von Interesse sind. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass durch Co-Suppression erzeugte Virusresistenzen durch virale Faktoren wiederum selbst einem *silencing* unterliegen können. Diese Fälle von Transgen-Instabilität werden im Unterkapitel 3.11.2 behandelt.

3. Publikationen, in denen die Instabilität von Transgenen aus anwendungsorientierter Sicht betrachtet wird, die auch Untersuchungen an Nutzpflanzen beinhalten und in der Regel das Verhalten von Transgenen über mehrere Generationen (bei Samenpflanzen) bzw. über längere Propagationsphasen (bei vegetativ zu vermehrenden Arten) beschreiben. Bezüglich des

methodisch-technischen Niveaus ist diese Gruppe allerdings sehr heterogen. Die molekularbiologischen Analysen entsprechen in ihrer Genauigkeit zumeist nicht denjenigen aus den Untersuchungen der Gruppen (1) und (2). Ein gewisses Problem bei der Zuordnung von Publikationen zu dieser Gruppe besteht darin, dass zwischen speziellen Untersuchungen zur Transgen-Instabilität und allgemeinen Veröffentlichungen zur Transformation von Pflanzen ein fließender Übergang besteht. Im Prinzip liefert jede Publikation, in der die Expression eines beliebigen Fremdgens in transgenen Individuen irgendeiner Pflanzenart beschrieben wird, eine Information zur Transgen(in)stabilität. In fast jeder dieser Studien werden Linien registriert, in denen Abweichungen vom erwarteten Vererbungsmodus oder ein Verlust der Genexpression innerhalb einer Generation auftreten. Da aber Untersuchungen, in denen die Stabilität des Transgens nicht direkt im Mittelpunkt steht, in der Regel keine *ausreichende* Datenmenge für eine fundierte Beurteilung der Situation enthalten, blieben solche Publikationen in der vorliegenden Studie weitgehend unberücksichtigt.

4. Eine vierte Gruppe betrifft Publikationen zum Thema Mutation und interchromosomale Rekombination in Pflanzen, d.h. niedrigfrequenten Ereignissen, die die Stabilität von (Trans)genen beeinflussen.

Berücksichtigt wurden darüber hinaus Publikationen, die spezielle Aspekte und Details zu Regulationsmechanismen auf genetischer und physiologischer Ebene beschreiben, die in Zusammenhang mit verschiedenen Phänomenen der Instabilität transgener Merkmale stehen.

3.2 GLIEDERUNG DER DOKUMENTATION

In der Einleitung wurde bereits auf die Komplexität des Themas hingewiesen. Es sollte deutlich geworden sein, dass die Vielfalt von Phänomenen und Mechanismen, sowie deren häufig unklare Relation die Erstellung von Ordnungsprinzipien sehr erschwert. Eine Dokumentation zur Stabilität oder Instabilität von Transgenen steht deshalb vor der Aufgabe, mehr oder weniger vollständige Datensätze, z.T. sehr spekulative Interpretationen und häufig reine Phänomenbeschreibungen zusammenzustellen und ordnen zu müssen. Hinzu kommt, dass die Autoren dieser Veröffentlichungen unterschiedliche Fragestellungen bearbeiten und sich daher auch in den angewandten Methoden sehr unterscheiden.

Für eine möglichst umfassende und gleichzeitig übersichtliche Darstellung wurde deshalb eine Gliederung des Materials nach verschiedenen Aspekten, die in Zusammenhang mit der Instabilität von Transgenen stehen bzw. unter denen dieses Thema wissenschaftlich bearbeitet wird, vorgenommen (Abbildung 3). Die daraus resultierenden Unterkapitel (3.4 – 3.12) beschreiben dabei Inhalte auf unterschiedlichen Ebenen, entsprechend der Heterogenität der vorliegenden Publikationen. Die Dokumentation versucht damit, die gesamte Bandbreite der Zielstellungen und experimentellen Vorgehensweisen zu erfassen, ausgehend von der *in situ*

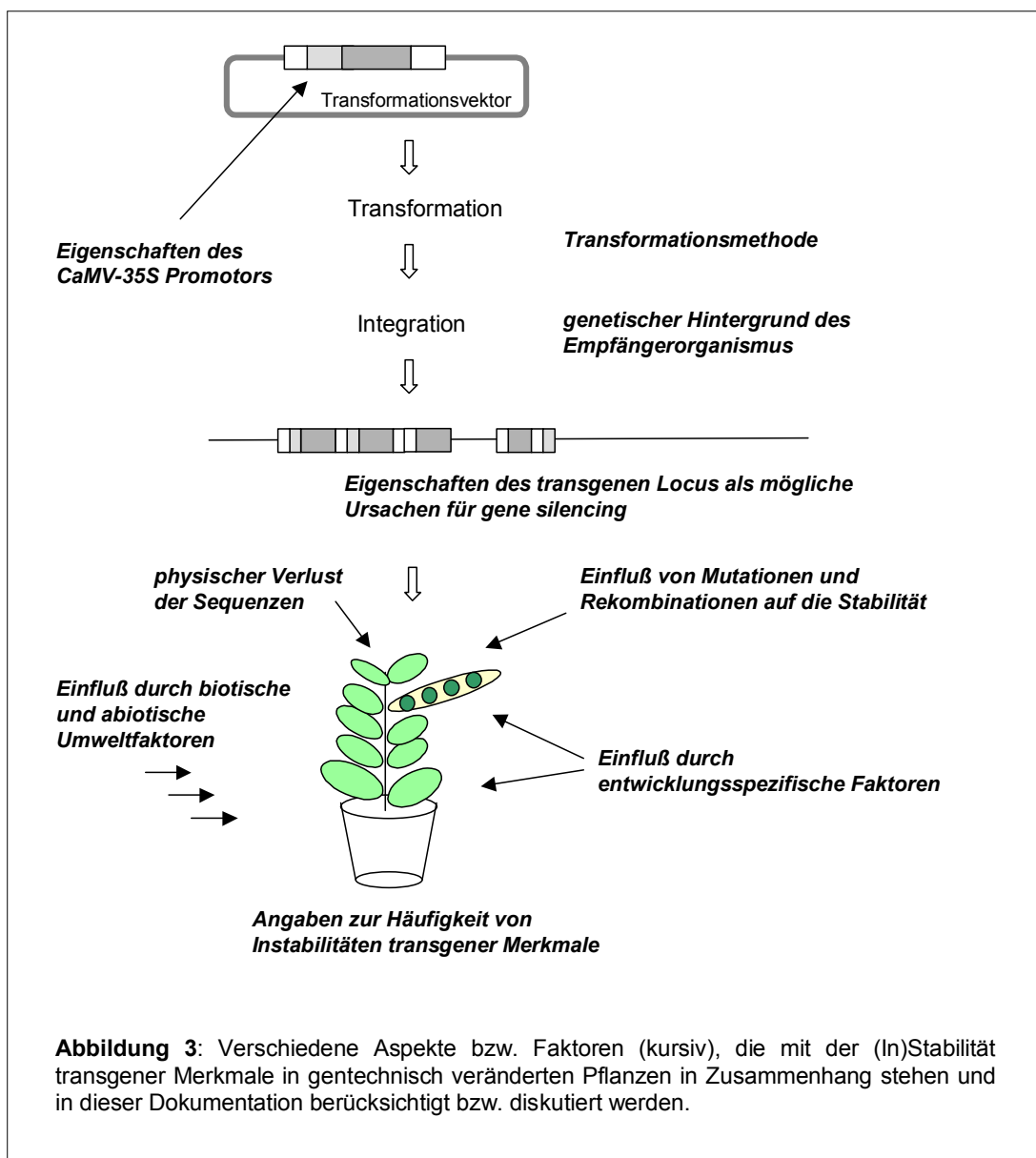
Lokalisation einzelner Transgene in distinkten Chromosomenabschnitten bis hin zu Untersuchungen, in denen keine einzelnen Linien analysiert, sondern Segregationsanalysen mit mehreren hunderttausend Individuen vorgenommen wurden. Viele Veröffentlichungen enthalten mehrere Fragestellungen und lassen sich deshalb nicht nur einem der Unterkapitel zuordnen. Nicht selten wird ein Artikel deshalb mehrfach in unterschiedlichen Sparten zitiert sein. Wiederholungen des Inhalts werden jedoch durch Querverweise vermieden. Eine Reihe von Tatbeständen lässt sich darüber hinaus je nach Sichtweise dem einen oder anderen Aspekt zuordnen. Dies wird durch entsprechende Hinweise im Text berücksichtigt. Letztendlich ist auch zu vergegenwärtigen, dass in vielen Fällen nicht nur eine, sondern mehrere Ursachen einen Merkmalsverlust bedingen und folglich ein „Gemisch“ an Instabilitätsphänomenen erzeugen können, das aufgrund des generell geringen Kenntnisstandes schwerlich aufzulösen ist. Eine Kategorisierung der Ereignisse bzw. Phänomene kann daher letztendlich nur reduktionistisch sein und keinesfalls allen Ansprüchen genügen.

Folgende Aspekte wurden in der Dokumentation berücksichtigt:

- Abschnitt 3.3 enthält eine phänomenologische Beschreibung der verschiedenen Varianten der Transgen-Instabilität, d.h. wie sich die verschiedenen Formen der Merkmalsinstabilität äußern können und wie sie detektiert werden. In diesem Zusammenhang wird auch das Problem der unterschiedlicher Definitionen der Begriffe *gene silencing* und Instabilität in der Literatur erörtert.
- In Abschnitt 3.4 werden die Eigenschaften transgener Loci und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung von *gene silencing*-Phänomenen beschrieben.
- In Abschnitt 3.5 werden die Beispiele dokumentiert, in denen ein physischer Verlust der transgenen Sequenz(en) beschrieben wurde.
- In Abschnitt 3.6 wird die Bedeutung von niedrigfrequenten Ereignissen wie Mutationen und Rekombinationsereignisse für die Stabilität von Transgenen erörtert.
- Abschnitt 3.7 enthält Informationen über den CaMV35S-Promotor, der in mindestens 90% aller Studien im Bereich der „grünen“ Gentechnik zur Kontrolle der Transgenexpression verwendet wurde und dessen Eigenschaften gelegentlich mit der Instabilität von Transgenen in Verbindung gebracht wird.
- Abschnitt 3.8 behandelt die unterschiedlichen Transformationsmethoden, die Einfluss auf die Stabilität aufgrund der unterschiedlich erzeugten Integrationsmuster besitzen können.
- In Abschnitt 3.9 wird die Bedeutung des genetischen Hintergrundes diskutiert – dies betrifft zum einen phylogenetische Unterschiede zwischen Spender und Empfängerorganismus, zum anderen Ploidie- und Genotypenabhängigkeit der Instabilität.

- In Abschnitt 3.10 werden entwicklungsspezifische Einflüsse auf die Merkmalsstabilität beschrieben.
- In Abschnitt 3.11 werden die Fälle dokumentiert, in denen biotische und abiotische Umweltfaktoren die Merkmalsstabilität von Transgenen beeinflusst haben.
- In Abschnitt 3.12 werden die Angaben zur Häufigkeit, mit der Instabilitäten transgener Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen auftreten, diskutiert.

In einigen Kapiteln werden die veröffentlichten Informationen und Daten in tabellarischer Form dargestellt.

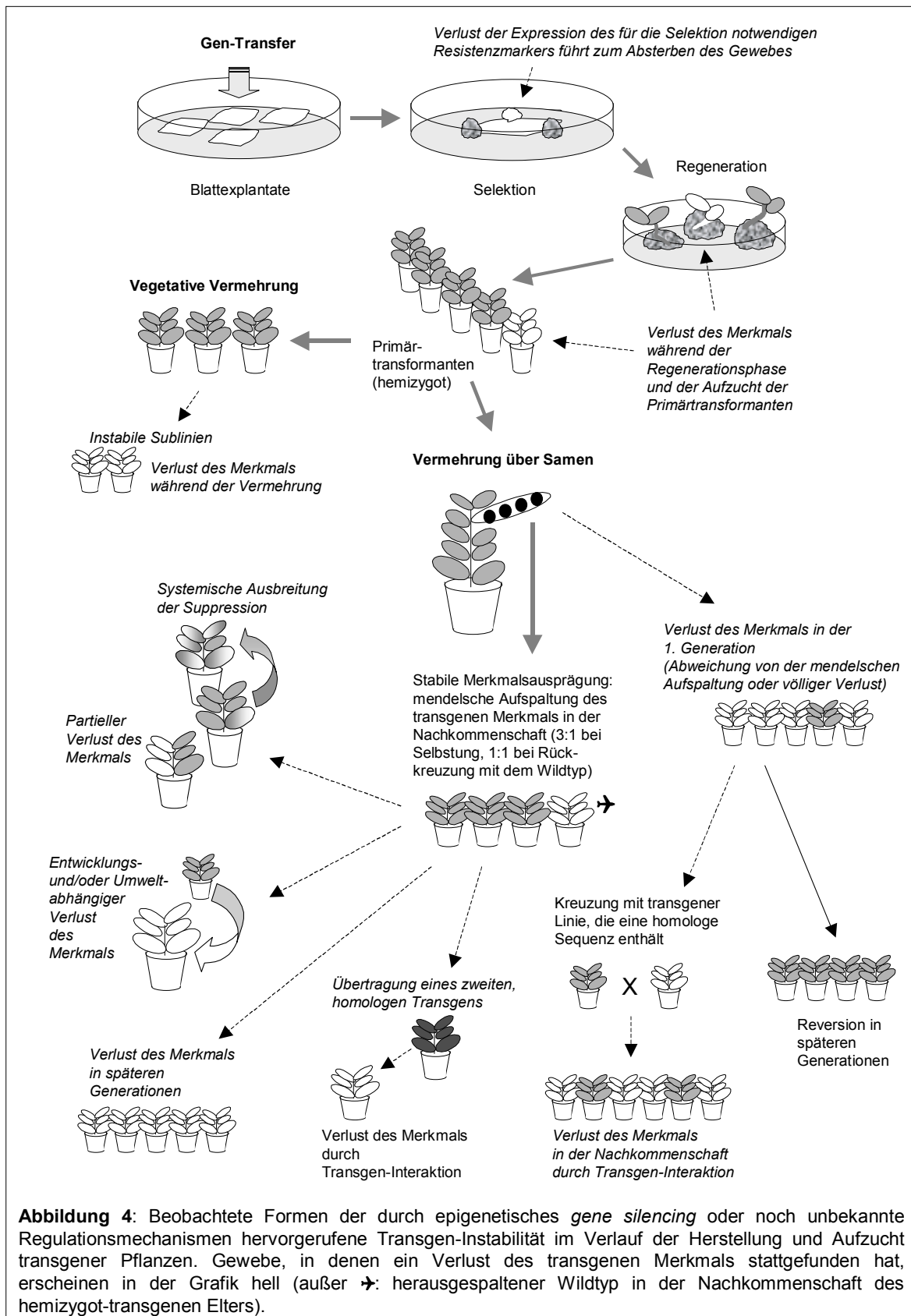


3.3 PHÄNOMENOLOGISCHE BETRACHTUNG DER VERSCHIEDENEN FORMEN DER INSTABILITÄT

Die schematische Darstellung in Abbildung 4 zeigt den groben Verlauf eines Transformationsexperimentes, der Aufzucht der Primärtransformanten sowie die Vermehrung von transgenen Pflanzen über Samen oder vegetativ über Stecklinge. Gewebe, in denen ein Verlust des transgenen Merkmals oder eine Veränderung der Ausprägung stattgefunden hat bzw. beobachtet werden kann, erscheinen in der Grafik weiß. Tatsächlich ist ein solcher Verlust der Expression bei Verwendung einiger morphologischer Markergene in ähnlicher Weise direkt sichtbar, z.B. *rolB* und *rolC* aus *Agrobacterium rhizogenes*, deren Produkte in den Phytohormonhaushalt der Pflanzen eingreifen und das Erscheinungsbild derjenigen Pflanzen verändern, in denen diese Gene aktiv sind. Bei einem Verlust oder einer Inaktivierung des Transgens revertieren die Pflanzen bzw. Organe oder Gewebe wieder zum normalen Phänotyp (Dehio und Schell 1994, Schmülling und Röhrig 1995, Fladung 1996). Bei Verwendung biochemischer Marker ist hingegen eine Aufarbeitung des Gewebes unumgänglich. Zeigt sich die Instabilität allerdings nicht in Form eines vollständigen Verlustes sondern als Änderung der Genaktivität, sind quantitativ messbare biochemische Marker wiederum von Vorteil. Sehr häufig wird in Untersuchungen zur Transgen-Instabilität das Reportergen GUS (β -Glucuronidase aus *E. coli*) eingesetzt, hier lässt sich die Genexpression sowohl *in situ* durch eine Farbreaktion im Gewebe als auch über eine quantitative Bestimmung nachweisen. Einen technisch wenig aufwendigen und auch bei großen Zahlen von Individuen einsetzbaren Nachweis der Genexpression ermöglichen auch Antibiotika- und Herbizid-Resistenzgene, deren Aktivität z.B. durch Keimung von Samen auf antibiotikahaltigen Medien oder durch Besprühen der Pflanzen im Gewächshaus mit dem entsprechenden Herbizid innerhalb kurzer Zeit überprüft werden kann.

Das Schema in Abbildung 4 beginnt mit der genetischen Transformation unter *in vitro* Bedingungen, am Beispiel der für viele Pflanzenarten üblichen, mit dem *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer kombinierten *leaf-disk* Methode⁸. Im Anschluss an die *Agrobacterium*-Behandlung werden die Gewebe durch Zugabe entsprechender Phytohormone zur Zellteilung und Kallusbildung angeregt, gleichzeitig aber auch einer Selektion unterzogen, um die Proliferation nicht transformierter Zellen zu verhindern. Zu diesem Zweck enthalten die Übertragungsvektoren, neben dem eigentlichen *gene of interest*, einen Selektionsmarker, zumeist eine Antibiotikum-Resistenz, die für die späteren Untersuchungen oder Anwendungen der transgenen Linien keine Bedeutung hat. Ein Expressionsverlust des Resistenzmarkers in dieser Phase würde zum Absterben des Gewebes führen, ein solcher Vorgang wird in der Regel deshalb nicht erfasst. Es ist aber anzunehmen, dass auch schon während der Selektionsphase Klone aufgrund solcher Instabilitäten ausfallen.

⁸ nur im Fall der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und der Leguminose *Medicago truncatula* ist man bislang in der Lage, auf Gewebekulturtechniken verzichten zu können.



Während der Sprossregeneration und der anschließenden Aufzucht der Primärtransformanten findet üblicherweise eine Durchmusterung der Transformanten mittels molekularbiologischer und biochemischer Analysen statt. Dies ist notwendig, da verschiedene Linien eines Transformationsexperimentes in ihrer Expressionshöhe sehr stark variieren, eine Beobachtung, die als Positionseffekt bezeichnet wird (Peach und Velten 1991, s. Abschnitt 3.4.1). Eine zu diesem Zeitpunkt ermittelte niedrige oder nicht vorhandene (bzw. unterhalb der Nachweisgrenze liegende) Expression des *gene of interest* kann auf einem Verlust der Expression während der vorangegangenen *in vitro* Kulturphasen beruhen, oder aber auf einem möglicherweise stabilen Positionseffekt, der von Beginn an bestanden hat; eine Unterscheidung wird an dieser Stelle in den meisten Untersuchungen nicht vorgenommen. Instabilitäten in der Genaktivität lassen sich während dieser Phasen jedoch gut mit Hilfe morphologischer Marker (z.B. *ro/C*, s. oben) verfolgen.

Je nach Pflanzenart erfolgt die weitere Vermehrung der Linien über Samen oder vegetativ. Bei der Samenvermehrung können sich Instabilitäten als Abweichung von der erwarteten Aufspaltung äußern (Transgene segregieren wie natürliche Gene den Mendelschen Regeln entsprechend). Das Ausmaß der Instabilität kann dabei je nach Linie und in Abhängigkeit von Umweltfaktoren (s.u.) variieren, zwischen vollständigem und selten auftretendem stochastischem Merkmalsverlust. Produzieren die Pflanzen relativ wenige Samen (z.B. Körnerleguminosen), lässt sich ein mit geringer Frequenz auftretender Expressionsverlust in der ersten Generation kaum feststellen; erst in späteren Generationen wird eine solche Instabilität sichtbar (z.B. Meixner *et al.* 1995). Bei Arten wie Tabak, Petunie oder *Arabidopsis thaliana* mit mehreren hundert bis tausenden von Samen pro Pflanze lassen sich derartige Untersuchungen deshalb effizienter gestalten (z.B. Müller *et al.* 1987, Meza *et al.* 2001). Zunächst stabile Linien können in einer späteren Generation instabil werden (z.B. Iglesias *et al.* 1997), oder des Ausmaß des Merkmalsverlustes nimmt im Verlauf mehrerer Generationen zu (z.B. Kilby *et al.* 1992). Darüber hinaus existieren Fälle, in denen ein nicht-exprimierter Locus nach Einkreuzung in eine stabil exprimierende Linien diese ebenfalls *silenced* (*silencer loci*, Vaucheret 1993) oder nach Kreuzung zweier exprimierender Linien ein Teil der Nachkommen einem *silencing* unterliegen (Matzke *et al.* 1993). Ein aktives Transgen kann auch durch eine erneute Transformation mit einer zweiten, homologen Sequenz inaktiviert werden, wie dies in einer der Pionierarbeiten zum Thema *gene silencing* gezeigt wurde (Matzke *et al.* 1989). Ein Verlust der Expression kann gleichfalls bei vegetativer Vermehrung auftreten (Fladung 1996, 1999), allerdings existieren hierüber weitaus weniger Berichte.

Die Stabilität der Expression kann von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren abhängig sein. Dies kann sich darin äußern, dass ein Verlust oder eine Verringerung der Expression erst in bestimmten Stadien der Pflanzenentwicklung oder unter bestimmten Umweltbedingungen realisiert wird. Ein Expressionsverlust kann sich auch partiell in bestimmten Zellen, Geweben oder Teilen der Pflanzen etablieren (Palauqui *et al.* 1996, Fladung

1999) und sich unter Umständen von dort systemisch ausbreiten (Boerjan *et al.* 1994, Fagard und Vaucheret 2000b). Die Bedeutung von morphologischen (*rolC*) und *in situ* Markern (GUS, GFP) zur Detektion solcher partiell auftretenden Instabilitäten ist offensichtlich. Gene, die in Kombination auf einem Vektor zusammen übertragen werden, können sich im übrigen durchaus unterschiedlich verhalten, d.h. eines verbleibt im aktiven Status, das andere dagegen ist Faktoren ausgesetzt, die eine Expression verhindern.

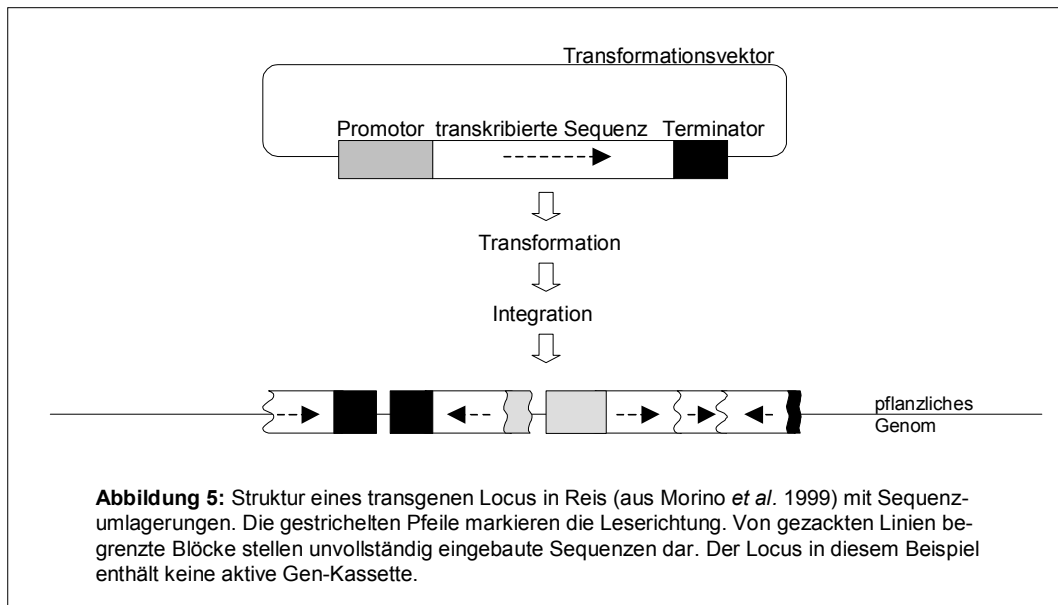
Bei der Vielfalt von Phänomenen ist es nicht überraschend, dass die Auffassungen darüber, was „Instabilität“ transgener Merkmale im einzelnen bedeutet, nicht immer übereinstimmen. Auch der Begriff *gene silencing* ist nicht eindeutig definiert: während Mittelsten-Scheid und Paszkowski (2000) die Eingrenzung vornehmen „*gene silencing leads to loss of previously active loci*“, benutzen andere Autoren diesen Begriff auch für eine von Beginn an bestehende schwache Expression (z.B. Cervera *et al.* 2000). Es wird darüber hinaus auch deutlich, dass bestimmte Merkmalsverluste nicht bemerkt werden, wenn dies die experimentelle Vorgehensweise nicht erlaubt. Wird z.B. der Verlust der Kanamycinresistenz lediglich durch Keimungstests auf Antibiotikum-haltigen Medium ermittelt, lässt sich eine mögliche Inaktivierung des Gens in späteren Stadien nicht erfassen. Zur Evaluierung der Stabilität von Resistenzmarkergenen sind Resistenztests auch deshalb nur bedingt geeignet, da in solchen Tests quantitative Veränderungen nicht erfasst werden. Auch bei einer Verminderung der Gen-Aktivität wird u.U. noch so viel Enzym produziert, dass die Pflanzenzellen ihre Resistenzeigenschaft beibehalten. Andererseits ermöglichen Resistenztests ein Screening tausender von Individuen mit relativ geringem Aufwand und können Instabilitäten, die mit niedriger Frequenz auftreten, erst sichtbar machen.

Nicht nur auf experimenteller Ebene, auch in der Anwendung ist ein Ausfall der Expression eines Transgens nicht unbedingt erkennbar. So bliebe z.B. ein (reversibler) Ausfall einer Herbizidtoleranz bei Temperaturen über 37°C unbemerkt, wenn die Spritzungen (wie normalerweise üblich) bei Temperaturen unterhalb dieser Grenze vorgenommen werden. Viele Daten und Interpretationen, vor allem aber Angaben zur Frequenz (s. Abschnitt 3.12), mit der Instabilitäten zu beobachten sind, müssen deshalb häufig individuell in Zusammenhang mit der jeweiligen experimentellen Vorgehensweise, der Definition des Begriffes Instabilität sowie u.U. auch der Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit betrachtet werden.

3.4 BEDEUTUNG DER EIGENSCHAFTEN DES TRANSGENEN LOCUS IN ZUSAMMENHANG MIT DER INAKTIVIERUNG VON GENEN DURCH *GENE SILENCING*

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die Stabilität transgener Merkmale vorrangig von der Beschaffenheit des transgenen Locus beeinflusst wird. In Pflanzen erfolgt die Integration fremder Gene bevorzugt über eine nicht-homologe oder illegitime Rekombination (Vergunst und Hooykaas 1999). Die Position des transgenen Locus lässt sich deshalb gegenwärtig nicht

kontrollieren, d.h. der Einbau der fremden Gensequenzen in das Genom erfolgt „zufällig“. Darüber hinaus können vor und während der Integration mehr oder weniger vielfältige Sequenzumlagerungen stattfinden. Ein Beispiel für derartige Umlagerungen zeigt Abbildung 5 (aus Morino et al. 2000).



Die Erfahrung hat gezeigt, dass bestimmte Eigenschaften transgener Loci das Potential für ein „Abschalten“ von Transgenen bergen und einige Locus-Strukturen mit bestimmten *silencing*-Phänomenen korrelieren. Einfluß auf die Expressionsstabilität besitzt auch der genomische Kontext, der aufgrund der „zufälligen“ Integration ebenfalls für jede Linie eine individuelle Eigenschaft darstellt.

In diesem Abschnitt wird der Versuch unternommen, Untersuchungsergebnisse zu dieser Fragestellung zu dokumentieren, wobei nicht die vollständige Erfassung sämtlicher Publikationen sondern die Vollständigkeit der zu erfassenden Informationen im Vordergrund stand. Die einzelnen Abschnitte enthalten z.T. schematische Darstellungen der Erklärungsmodelle des *gene silencing*, die sich weitgehend an verschiedenen Abbildungen aus Reviews von Stam *et al.* (1997b), Matzke und Matzke (1998a, 1998b) und Waterhouse *et al.* (1999) orientieren.

3.4.1 Positionseffekte: Einfluss durch den genomischen Kontext

Der für jede transgene Linie spezifische genomische Kontext (Abbildung 6) besitzt Einfluss auf Höhe und Stabilität der Expression. Dieser als Positionseffekt bezeichnete Einfluss (Peach und Velten 1991, Matzke und Matzke 1998a) bewirkt, dass verschiedene Linien eines Transformationsexperimentes in ihrer Expressionshöhe erheblich variieren können. Positionseffekte beruhen auf (i) der Wirkung von in der Nähe des Integrationsortes liegenden

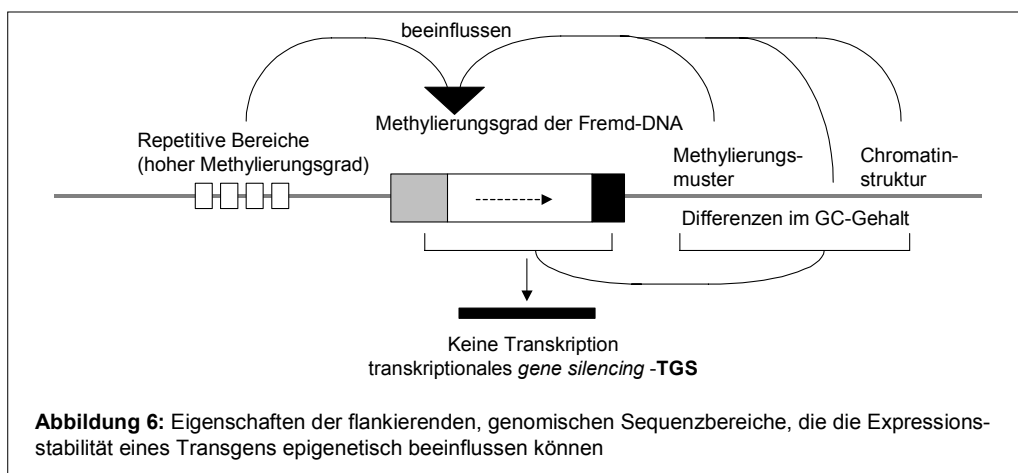
Sequenzelementen wie z.B. Enhancern und (ii) Faktoren, die die Expression des Transgens direkt oder indirekt über epigenetische Regulationsmechanismen steuern. Positionseffekte können die Expression eines Gens „stabil“ beeinflussen, etwa eine dauerhaft ausgeprägte schwache Expression oder vollständige Unterdrückung eines Transgens bewirken. In solchen Fällen handelt es sich genaugenommen nicht um eine „Instabilität“ - trotzdem werden auch derartige Beispiele in diesem Abschnitt berücksichtigt, da dieser Effekt auf der Wirkung epigenetischer Faktoren wie z.B. Methylierungsmuster oder Chromatinstruktur beruhen kann.

Da die Bedeutung und Eigenschaften der den transgenen Locus flankierenden Bereiche des Empfänger-genoms unbekannt sind und sich zudem in jeder Linie voneinander unterscheiden, sind Voraussagen über ihren Einfluß auf die Expressionsstabilität eines Transgens am schwierigsten zu treffen. Linien, die unter idealen Gewächshausbedingungen eine stabile Expression aufwiesen, können im Freiland ein ganz anderes Verhalten zeigen. Deshalb sind es gerade die Positionseffekte, die eine Überprüfung der Stabilität eines Transgens unter möglichst vielen und praxisnahen Umweltbedingungen erforderlich macht.

Die mit dem genomischen Kontext in Zusammenhang stehenden *gene silencing*-Effekte verhindern die Expression des Gens auf Transkriptionsebene, d.h. es wird ein transkriptionales *gene silencing* (TGS) verursacht.

Der genomische Kontext ist, soweit bekannt, gekennzeichnet durch

- den Chromosomenbereich, in dem sich die übertragenen Sequenzen befinden
- die Chromatinstruktur
- den Methylierungsstatus
- eventuell vorhandene repetitive Sequenzbereiche
- mobile Elemente wie Transposons
- einen spezifischen GC-Gehalt



In Untersuchungen zur Aufklärung der Ursachen des *gene silencing* wurden die Eigenschaften der genomischen Bereiche, in denen sich stabil und instabil exprimierende bzw. aktive und inaktive Loci befanden, hinsichtlich einiger dieser Komponenten analysiert. Nicht selten werden in diesem Zusammenhang experimentelle Ansätze verfolgt, in denen Konstrukte mit Sequenzen übertragen werden, die „im Verdacht stehen“ ein *gene silencing* auszulösen oder zumindest daran beteiligt sein können.

Position des transgenen Locus im Chromosom

Zytogenetische Analysen zur Lokalisation von transgenen Loci wurden in mehreren Studien durchgeführt, aber nur in wenigen Fällen wurde versucht, eine Korrelation zwischen der Stabilität der Expression und der Position des Locus im Chromosom herzustellen. In der Arbeitsgruppe von Marjori und Antonius Matzke wurden einige stabile und instabile Linien unter Verwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung näher charakterisiert (Matzke und Matzke 1998). In stabilen Linien befanden sich transgene Loci im Bereich der Chromosomenenden, in der Nähe von Telomeren, während bei instabilen Linien eine Integration in interkalare und paracentromere Abschnitte des Chromosoms festgestellt wurde (Park *et al.* 1996, Iglesias *et al.* 1997, Jakowitsch *et al.* 1999). Instabile Loci, die in Telomer-Abschnitten lokalisiert wurden, waren von Heterochromatin flankiert (heterochromatische Bereiche stellen transkriptions-inaktive Genomabschnitte dar). Die Zahl der insgesamt untersuchten Linien ist allerdings relativ klein und es ist fraglich, ob hieraus allgemeingültige Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Methylierungsgrad und repetitive Sequenzen in den angrenzenden Bereichen des Wirtsgenoms

„Stillgelegte“ Transgene weisen i.d.R. einen erhöhten Grad an Cytosin-Methylierungen auf (Meyer 1998, Vaucheret und Fagard 2001, Paszkowski und Whitham 2001). Die Hypermethylierung ist jedoch keine spezifische Eigenschaft inaktiver oder instabiler transgener DNA-Sequenzen, sondern stellt eine natürliche, reversible Form der DNA-Modifizierung dar, die auf noch unbekannte Weise mit epigenetischen Regulationsmechanismen in Zusammenhang steht. Nachdem man C-Methylierungen im Genom von Säugetieren hauptsächlich an Cytosin-Guanosin (CG)-Stellen gefunden hatte, wurde schon vor 20 Jahren erwogen, dass es sich bei der C-Methylierung um eine sequenzunabhängige, jedoch aufgrund der CG-Symmetrie an Tochterzellen bzw. Nachkommen vererbare Markierung von DNA-Abschnitten handeln könnte (s. Robertson und Wolffe 2000). In Pflanzenzellen können außer CG-Stellen auch CNG-Stellen (N=beliebiges Nukleotid) methyliert sein (s. Finnegan und Kovac 2000), die ebenfalls bei der Replikation kopiert werden können. Darüberhinaus wurden bei Pflanzen allerdings auch vererbare C-Methylierungen an nicht-symmetrischen Stellen gefunden (Meyer *et al.* 1994), für die dieser einfache Kopiermechanismus nicht gelten kann.

Es ist unklar, ob es sich bei der Methylierung um die Ursache oder um eine Folge des Prozesses handelt, der zur Inaktivierung von Genen führt. Da C-Methylierungen in

verschiedenen Organismen (*Drosophila*, *Caenorhabditis*, Hefe) nicht oder nur in geringem Ausmaß vorkommen, ist es fraglich, ob eine ursächlicher Zusammenhang zwischen Methylierung und der Inaktivierung von Genen besteht.

Methylierungen im Promotorbereich eines Gens stehen häufig mit dem Verlust der Transkriptionsaktivität in Verbindung (transkriptionales *gene silencing*), während eine Hypermethylierung der transkribierten oder codierenden Bereiche bei Genen zu finden ist, die ein posttranskriptionales *gene silencing* aufweisen (Sijen und Kooter 2000). Innerhalb dieser Sequenzbereiche können sich Methylierungen u.U. ausbreiten, seltener hingegen vom Promoter auf den codierenden Bereich und umgekehrt.

Aus Untersuchungen an gentechnisch veränderten Pflanzen ist bekannt, dass häufig solche Gene bzw. Loci von Methylierungen betroffen sind, die aufgrund einer multiplen Insertion mehrfach vorhanden sind oder Sequenzumordnungen mit direkten und invertierten Sequenzwiederholungen aufweisen (s. Abschnitt 3.4.3).

Aus Analysen transgener Petunien, die das Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) und das A1-Gen (Dihydroflavonol-Reduktase-Gen aus *Zea mays*, dessen Expression eine lachsrote Blütenfarbe bewirkt, s. 3.11.1) jeweils in einer Kopie enthielten, schlossen Pröls und Meyer (1992), dass für die Hypermethylierung eines Gens u.U. auch die flankierenden Sequenzbereiche des Wirtsgenoms verantwortlich sein können. Eine der drei untersuchten Linien (Transformante 16), in der beide Gene in einem inaktiven Zustand vorlagen, enthielt in den angrenzenden Bereichen des Petuniengenoms hypermethylierte, repetitive Sequenzen, während die Transgene der anderen beiden Linien in hypomethylierte Bereiche integriert waren und stabil exprimiert wurden. Pröls und Meyer vermuteten, dass eine Ausbreitung des Methylierungsmusters repetitiver, genomischer Sequenzen auf die transgenen Sequenzen erfolgen kann.

Bestätigt wurde diese Vermutung in einer Arbeit von Ten Lohuis *et al.* (1995). Aus dem hypermethylierten, genomischen Bereich der Transformante 16 wurde eine genomische Sequenzwiederholung von 57 bp isoliert und mit Reporter- und Resistenzmarker-Genkassetten auf einem Transformationsvektor kombiniert. Tabakpflanzen, die mit diesem Konstrukt transformiert wurden, wiesen eine signifikant höhere Variabilität und Instabilität der Transgen-Expression auf. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Anwesenheit des 57bp-Sequenzwiederholung eine *de novo* Methylierung der angrenzenden Sequenzen initiieren kann.

Der Einfluß von Sequenzwiederholungen auf die Stabilität benachbarter Transgene untersuchten auch English und Jones (1998). Sie erzeugten transgene Tabaklinien mit einem Streptomycin-Resistenzgen, das gleichzeitig ein internes AC-Element enthielt. Hierbei handelt es sich um einen Bestandteil eines „springenden Gens“ (Transposon), das sich aus einer Sequenz herauslösen und an anderer Stelle, zumeist nicht sehr weit entfernt vom ursprünglichen Ort, wieder integrieren kann. Eine Resistenz gegenüber Streptomycin entsteht erst im Falle einer Exzision dieses Elementes. Unter den Nachkommen fanden English und

Jones neben vollständig resistenten Linien auch solche mit grün-weiss gemusterten Blättern⁹, in denen aufgrund eines somatischen *silencing*-Effektes die Resistenz in einzelnen Gewebebereichen wieder zusammenbrochen war. Diese Eigenschaft war in den betreffenden Transformanten vererbbar. Aus insgesamt 111 Linien, in denen eine Excision des AC-Elementes stattgefunden hatte, wurden vier solcher Linien gefunden. Eine genauere Analyse der flankierenden Bereiche ergab, dass alle vier eine größere Zahl direkter AC-Sequenzwiederholungen in der Umgebung des Streptomycin-Resistenzgens besaßen, während sich in stabilen Linien nur ein bis zwei AC-Elemente fanden. Aus den Daten schlossen die Autoren auf eine enge Korrelation zwischen der Existenz dieser Sequenzwiederholungen und dem Auftreten des (in diesem Fall somatischen) *silencing*-Phänomens.

Transgene Loci mit flankierenden Sequenzwiederholungen lassen sich noch gezielter mit Hilfe des Cre-lox-Systems herstellen. Dieses Rekombinationssystem stammt aus dem Bakteriophagen P1 und besteht aus den Komponenten Cre-Rekombinase (*cyclisation recombination*) und 34bp lox-Erkennungssequenzen (*locus of crossing over*). Bei Anordnung von zwei lox-Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung werden diese von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten, inklusive der dazwischenliegenden Bereiche (Dale und Ow 1990, Übersicht bei Nagy 2000).

Um den Einfluss von Sequenzwiederholungen im Bereich des transgenen Locus unabhängig von möglichen Positionseffekten untersuchen zu können, erzeugten Matzke und Matzke (1998a) einen Transformationsvektor mit einem Kanamycin-Resistenzmarkergen und mehreren, von lox-Erkennungssequenzen eingerahmten, künstlichen Sequenzwiederholungen. Aus den mit diesem Konstrukt transformierten Tabakpflanzen wurden instabile Linien ausgewählt und mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Pflanzen gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung enthielten den gleichen transgenen Locus wie die zuvor ausgewählten, instabilen Ausgangseltern, jedoch ohne Sequenzwiederholungen, die durch die Aktivität der Cre-Rekombinase entfernt worden waren. Auf diese Weise ließ sich nachweisen, dass in ursprünglich instabilen Linien die Eliminierung von direkten Sequenzwiederholungen, die im Transformationsvektor in der Nähe des Promotors platziert worden waren, zu einer Reduzierung des Methylierungsgrades und einer (Re-)Aktivierung des entsprechenden Gens führen kann (Matzke und Matzke 1998a).

GC-Gehalt

Pflanzengenome bestehen aus Mosaiken von DNA-Segmenten mit übereinstimmenden GC-Gehalt, die als Isochore bezeichnet werden (Salinas *et al.* 1988, Matassi *et al.* 1989). Gene besitzen ebenfalls eine spezifische GC-Zusammensetzung und sind in die entsprechenden, bezüglich des GC-Gehalts „passenden“ Bereiche des Genoms eingebettet (Meyer 1998). Falls ein fremdes Gen in ein „unpassendes“ Isochor integriert, kann diese Region von (noch

⁹ Auf streptomycin-haltigem Medium verlieren Pflanzenzellen die Fähigkeit, Blattgrün zu produzieren, sterben jedoch nicht ab.

unbekannten) Überwachungssystemen des Empfänger-genoms erkannt und inaktiviert wird, was unter Umständen mit einer Methylierung der Region verbunden sein kann (Finnegan und McElroy 1994, Kumpatla *et al.* 1998). Eine solche Regulation vermuten Meyer und Heidmann (1994) in der unter Gewächshausbedingungen stabilen, unter Freilandbedingungen jedoch instabilen Petunien-Linie R17 (s. Abschnitt 3.11.1). Die den transgenen Locus in dieser Linie flankierenden genomischen Bereiche (269 Basenpaare stromaufwärts, 196 Basenpaare stromabwärts) besitzen einen AT Gehalt von 74% bzw. 77%, die integrierten Sequenzen dagegen 47.5%.

Der GC-Gehalt differiert darüber hinaus auch zwischen verschiedenen Organismen mehr oder weniger stark. Große phylogenetische Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerorganismus können deshalb zu Schwierigkeiten bei der Expression des Transgens in einem nicht „passenden“ Genom führen. So kann z.B. die Expression von Genen bakteriellen Ursprungs in Eukaryoten aufgrund unterschiedlicher RNA-Prozessierungsmechanismen oder Unterschiede im *codon usage* Probleme bereiten. Die in diesen Fällen beobachtete schwache oder nicht vorhandene Aktivität der Transgene ist jedoch keine Eigenschaft individueller Linien, sondern betrifft grundsätzlich alle produzierten Transformanten. Es handelt sich demnach um eine ganz andere Kategorie von Instabilität als im Fall des Isochore-Effektes, dessen Auswirkung u.a. vom „zufälligen“ Integrationsort abhängig ist und der deshalb nur bestimmte Linien betrifft. Die in Zusammenhang mit phylogenetischen Unterschieden zwischen Spender und Empfängerorganismus auftretenden Phänomene werden deshalb an anderer Stelle diskutiert (s. Abschnitt 3.9).

Eine destabilisierende Komponente, die u.U. ebenfalls auf unterschiedlichen GC-Gehalten zwischen Spender und Empfänger beruht, stellen bakterielle Vektorsequenzen dar. Solche Sequenzen befinden sich zum einen *zwischen* den (mehr oder weniger) eukaryotischen Genkassetten eines Transformationsvektors, zum anderen bilden sie das „Rückgrat“ (*backbone*) der Vektoren. Dass auch solche Sequenzen beim Transformationsprozess mit hoher Frequenz integrieren können, wurde lange Zeit wenig beachtet. Die wiederholten Berichte über Vektor-Integration und Instabilität haben uns veranlasst, diese in einem eigenen Unterkapitel zu dokumentieren (s. Abschnitt 3.4.2).

3.4.2 Instabilität durch Integration von Vektor-Sequenzen

Der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer galt lange Zeit als sehr präzise, ausgehend von der Annahme, dass nur ein definiertes DNA-Fragment, die Transfer- oder T-DNA, in das Genom der Pflanzenzellen übertragen wird (s. z.B. Hooykaas und Schilperoort 1992, Zupan und Zambryski 1995). Schon 1983 fanden Joos *et al.* in Untersuchungen an *Agrobacterium tumefaciens*-induzierten Tumoren neben dem Einbau der von spezifischen *border*-Sequenzen flankierten Transfer-DNA auch außerhalb dieses Bereichs liegende Plasmid-Sequenzen im Genom der Pflanzenzellen. Diese Ergebnisse blieben jedoch lange Zeit unbeachtet. Detaillierte Analysen

der mit Hilfe des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers erzeugten transgenen Pflanzen zeigten allerdings, dass solche als *backbone*-Sequenzen bezeichneten Vektorbereiche mit hoher Frequenz ins Genom integrieren können (Ramanathan und Veluthambi 1995, Cluster *et al.* 1996, van der Graaff *et al.* 1996, Kononov *et al.* 1997, Stam *et al.* 1997a, Wenck *et al.* 1997, Gelvin 1998, Matzke and Matzke 1998, De Buck *et al.* 2000). Nach Angaben dieser Publikationen enthalten zwischen 20% und 75% der transgenen Linien *backbone*-Anteile in unterschiedlichem Ausmaß.

Direkte Transformationsmethoden, in denen „nackte“ DNA (i.d.R. Plasmide) in die Zellen eingebracht werden (mit Hilfe Partikel-Kanone oder bei der Protoplastentransformation) galten ursprünglich als weniger präzise als der *Agrobacterium*-vermittelte Transfer - hier existierten bereits Informationen über mögliche Rekombinationsereignisse, die vor der eigentlichen Integration ins Genom zwischen den Plasmiden stattfinden können, mit der Folge multipler (Tandem)-Insertionen mehr oder weniger vollständiger Vektoren (Jongsma *et al.* 1987). Aus Untersuchungen zur genetischen Manipulation von Säugetierzellen ist seit längerem bekannt, dass die Integration von Vektorsequenzen die Stabilität der Genexpression negativ beeinflussen kann, deshalb ist hier die Eliminierung dieser Vektoranteile üblich. Gegenwärtig werden auch bei der direkten Transformation (beim *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer ist dies nicht möglich) von Pflanzenzellen in zunehmendem Maße nur noch die „notwendigen“ Genkassetten verwendet (s. Abschnitt 3.8).

Einen Zusammenhang zwischen der Expressionsstabilität und der Existenz von *backbone*-Sequenzen in transgenen Pflanzen beschreiben erstmals Cluster *et al.* (1996). Eine Zusammenstellung der Publikationen, in denen eine detaillierte Analyse des transgenen Locus in Verbindung mit Untersuchungen zu den Einflüssen von Vektorsequenzen auf die Stabilität der Genexpression vorgenommen wurde, befindet sich in Tabelle 1. Ein Grund für den negativen Einfluss auf die Expressionsstabilität wird darin gesehen, dass bakterielle Sequenzen durch ihren wesentlich höheren GC-Gehalt durch epigenetischen Regulationsmechanismen der Pflanzenzelle erkannt und „stillgelegt“ werden, inklusive der angrenzenden eukaryotischen Transgene (Yoder *et al.* 1997). Die *backbone*-Sequenzen enthalten darüber hinaus repetitive Bereiche (den bakteriellen Replikationsursprung), die bereits mehrfach als instabilisierender Faktor bezüglich der Genexpression identifiziert wurden (s. Abschnitt 3.4.3).

Hieraus ergibt sich ein Vorteil der direkten Transformationsmethoden, bei denen im Gegensatz zum *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer keine Notwendigkeit für den Einsatz vollständiger Vektoren vorliegt. Fu *et al.* (2000b) benutzten zur Herstellung transgener Reispflanzen nur die Expressionskassetten für den direkten Gentransfer. Molekularbiologische Analysen der Linien zeigten, dass die transgenen Loci eine weitaus weniger komplexe Struktur aufwiesen als diejenigen aus Vergleichsexperimenten, in denen vollständige Plasmiden eingesetzt wurden.

Nicht alle Linien, die Vektoranteile enthalten, sind instabil bezüglich der Ausprägung des transgenen Merkmals. Es handelt sich somit um ein ähnliches, von zufälligen Ereignissen

begleitetes Phänomen wie der Isochore-Effekt. Genau wie in diesem Fall ist auch hier bislang unbekannt, warum bzw. wann die Integration von Vektoranteilen zur Instabilität eines transgenen Locus führt.

Eine Methode zur Anreicherung von Transformanten ohne Vektoranteile für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer beschreiben Hanson *et al.* (1999). Hierzu wurden die *backbone*-Bereiche des Transformationsvektors mit einem konstitutiv exprimierten Letal-Gen (35S-barnase, s. Abschnitt 4.2) versehen. Transgene Zellen mit integrierten *backbone*-Sequenzen waren nicht lebensfähig und Linien ohne Vektoranteile ließen sich mit hoher Effektivität erzeugen. Da nicht alle Linien eines Transformationsexperimentes *backbone*-Sequenzen enthalten, lassen sich Pflanzen ohne *backbone*-Bereiche auch mit Hilfe molekulargenetischer Analysen des Integrationsortes identifizieren.

Tabelle 1: Untersuchungen, in denen die Expressions-Instabilität u.a. auf den Einbau von *backbone*-Sequenzen des Transformationsvektors zurückgeführt wird

Empfänger-spezies	Trans-formations Methode	Ziele bzw. Inhalte der Studie	Anmerkungen zu instabilen Linien	Referenz
<i>Petunia hybrida</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Untersuchungen zur Co-Suppression der Chalcon-synthase (Modifizierung der Blütenfarbe)	7 von 42 untersuchten Linien mit Vektorsequenzen z.T. auf beiden Seiten des Integrationsortes – alle 7 Linien mit starker Co-Suppression	Cluster <i>et al.</i> 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Korrelation zwischen Locusstruktur und Expressionsstabilität	von 4 untersuchten Linien 2 mit anfänglich hoher Expression verhielten sich instabil nach mehreren Generationen - eine der instabilen Linien besaß ein komplexes Muster der Integration inklusive unvollständiger T-DNA-Kopien, - die zweite instabile Linie besaß eine einzelne Kopie mit Vektorsequenzen im Bereich der rechten Border	Iglesias <i>et al.</i> 1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Stabilität der Antikörperproduktion in Pflanzen	von 5 untersuchten Linien 2 mit Vektorsequenzen - eine Linie mit Vektorsequenzen auf beiden Seiten des Integrationsortes zeigte in allen Individuen niedrige Expression und Methylierungen in codierenden Bereichen - eine Linie mit Vektorsequenzen im Bereich der linken Border zeigte in 50% der Individuen niedrige Expression und Methylierungen im Promotorbereich	De Neve <i>et al.</i> 1999
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Korrelation zwischen Locusstruktur und Expressionsstabilität	Charakterisierung mehrere instabiler Loci – ein H2-Locus enthält 6 nos-Promotor-Sequenzwiederholungen, von denen 2 von Vektoranteilen flankiert sind	Jakowitsch <i>et al.</i> 1999
<i>Oryza sativa</i>	Direkt (Partikel-Kanone)	Korrelation zwischen Locusstruktur und Expressionsstabilität	Charakterisierung einer Linie mit <i>silencing</i> -Effekten – beide Genkassetten (35S-Bt-cryIIIA und <i>UbiI-bar</i>) sowie große Mengen an Vektorsequenzen, die der Integrationsort enthielt, waren hoch methyliert.	Kumpatla und Hall 1999

3.4.3 Komplexität durch Sequenzumlagerungen am Integrationsort und multiple Insertion von Transgenen

Instabilitäten durch *gene silencing* werden häufiger in transgenen Linien beobachtet, die komplexe Loci mit Sequenzumlagerungen und/oder multiple Insertionen der Transgene aufweisen. Der negative Einfluss von Sequenzwiederholungen ist mehrfach nachgewiesen worden (z.B. Assaad *et al.* 1993, Stam *et al.* 1997a). Anschaulich illustriert eine Studie von Jorgensen *et al.* (1996) am Beispiel der Ausprägung der Blütenfarbe in transgenen Petunien die Beziehung zwischen der Struktur des transgenen Locus und dem *gene silencing*. Das in Petunien bereits endogen vorhandene Chalconsynthase-Gen war in *Sense*-Orientierung unter Kontrolle des 35S-Promotors zusätzlich als Transgen übertragen worden. Analysen der transgenen Loci ergaben, dass in Linien mit invertierten Sequenzwiederholungen am Integrationsort nur ein posttranskriptionales *gene silencing* auftrat, während einige der Pflanzen mit direkten und unzusammenhängenden Sequenzwiederholungen ein posttranskriptionales oder transkriptionales *gene silencing* zeigten.

Aufgrund der multiplen Insertionen, Sequenzwiederholungen und -Umlagerungen sowie Inversionen entstehen räumlich mehr oder weniger weit voneinander entfernte Homologiebereiche, die für *silencing*-Effekte verantwortlich gemacht werden. Hierfür wurde der Begriff *homology dependent gene silencing* (HDGS) geprägt (Meyer und Saedler 1996), wodurch sich diese Effekte von *silencing*-Phänomenen, die in Pflanzen mit einzelnen Kopien eines Transgens beobachtet wurden (z.B. Meyer *et al.* 1992, Elmayan *et al.* 1996), unterscheiden lassen. Sequenzhomologien entstehen auch nach Mehrfachtransformation oder Kreuzung transgener Linien, wenn hierbei gleiche Promotor- oder codierende Sequenzen benutzt bzw. kombiniert wurden. Ein HDGS kann auch, wie im Fall der oben erwähnten Untersuchung von Jorgensen *et al.* (1996), auftreten, wenn eine Sequenz übertragen wurde, die einer bereits im Genom des Empfängerorganismus natürlich vorhandenen Sequenz entspricht (s.u. Co- oder *Sense*-Suppression).

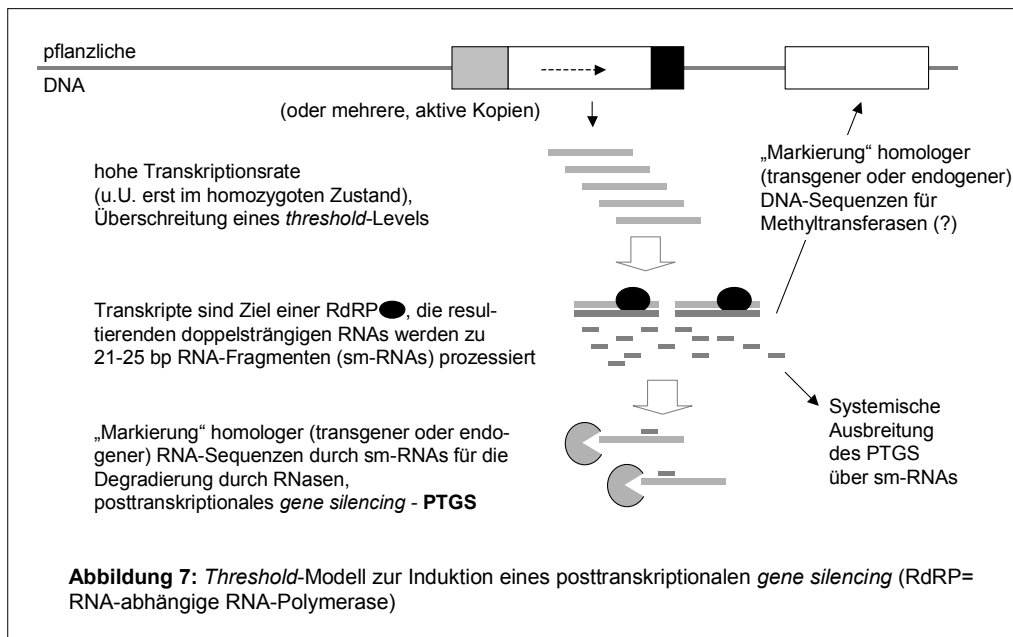
Während sich die Analysen der Struktur transgener Loci in der Vergangenheit häufig auf wenige genomische Blots stützten, werden heute in zunehmendem Maße detailliertere Analysen inklusive Sequenzierungen vorgenommen. Einbezogen werden hierbei auch angrenzenden Bereiche der Pflanzengenoms und der dort entstandenen Sequenzveränderungen (s. z.B. Morino *et al.* 1999, Kohli *et al.* 1999, Matzke *et al.* 2001). Dass transgene Loci einen sehr hohen Komplexitätsgrad besitzen können, ist jedoch keine neue Erkenntnis, bereits in der 80er Jahren wurden hierzu verschiedene Arbeiten publiziert (z.B. Jorgensen *et al.* 1987).

Erkenntnisse wurden u.a. auch dadurch gewonnen, dass man gezielt Strukturen, die im Verdacht stehen, ein *gene silencing* auszulösen, in Pflanzen übertragen hat. In diese Kategorie gehören auch *Sense*- und *Antisense*-Konstrukte, mit deren Hilfe man bestimmte endogene Gene eines Organismus gezielt „abzuschalten“ versucht. Dieser Effekt ist allerdings jeweils nur

bei einem geringen Teil der mit solchen Konstrukten transformierten Linien zu beobachten, die Mehrheit bleibt ohne Phänotyp. Um dieses Phänomen zu untersuchen, übertrugen Wang und Waterhouse (2000) das Reportergen GUS in verschiedenen Orientierungen (als Kontrollen GUS-*Sense* und –*Antisense*) und Sequenzformationen (als direkte und als invertierte Sequenzwiederholungen, um selbst-komplementäre mRNA-Sequenzen zu erzeugen) in zwei bereits transgene, das GUS-Gen stabil exprimierende Reislinien. Es wurde deutlich, dass invertierte und direkte Sequenzwiederholungen einen weitaus wirkungsvolleren Suppressionseffekt besitzen als einfache *Sense*- oder *Antisense*-Konstrukte. Darüber hinaus ließ sich anhand molekulargenetischer Analysen der transgenen Loci zeigen, dass diejenigen Linien, die mit einfachen *Sense/Antisense*-Konstrukten transformiert worden waren und eine Suppression des β -Glucuronidase-Gens zeigten, durch Sequenzumlagerungen entstandene invertierte Sequenzwiederholungen des GUS-Gens am Integrationsort enthielten. Die Transkripte solcher Wiederholungs-Strukturen, unabhängig davon, ob sie vorher bereits als solche konstruiert worden waren oder „zufällig“ durch Sequenzumlagerungen beim Integrationsprozess entstanden, war größtenteils nicht polyadenyliert (die Polyadenylierung der mRNA dient als Schutz vor einem Abbau durch RNasen). Wang und Waterhouse (2000) schließen aus ihren Ergebnissen, dass die *Sense*- und *Antisense*-vermittelte Gen-Suppression auf ähnlichen Mechanismen beruhen und der nicht-polyadenylierte Zustand der mRNA eine wichtige Rolle beim PTGS spielt.

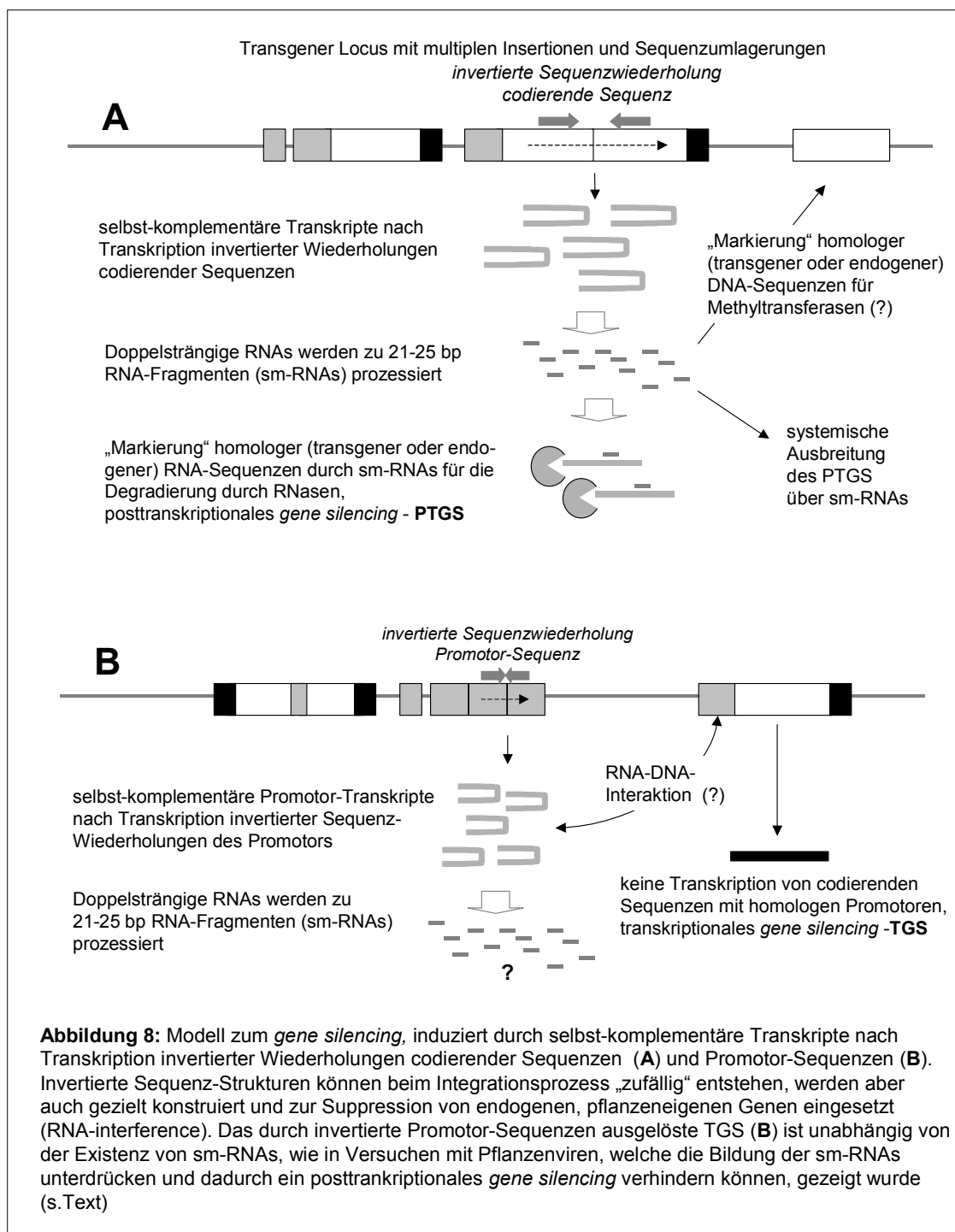
Die verschiedenen, in Zusammenhang mit dem HDGS beobachteten Phänomene ließen vermuten, dass hierfür nicht nur *ein* Mechanismus verantwortlich sein kann. Bereits 1991 wurden auf dem 3. Kongress der International Society of Plant Molecular Biologists in Tucson/Arizona vier Modelle diskutiert (Jorgensen 1992, im wesentlichen auch heute noch gültig, s. z.B. Waterhouse *et al.* 1999, Wolfe und Matzke 1999, Fagard und Vaucheret 2000a, Vaucheret und Fagard 2001). Eine Aufklärung der tatsächlichen Mechanismen steht noch aus, auch wenn der Nachweis der RdRP (RNA-abhängigen-RNA-Polymerase) in Pflanzen sowie ihrer Produkte, der kurzen, 21-25 bp RNA-Moleküle dieses Ziel etwas näher gerückt hat (s.u.). Die heute diskutierten Modelle lassen sich wie folgt beschreiben:

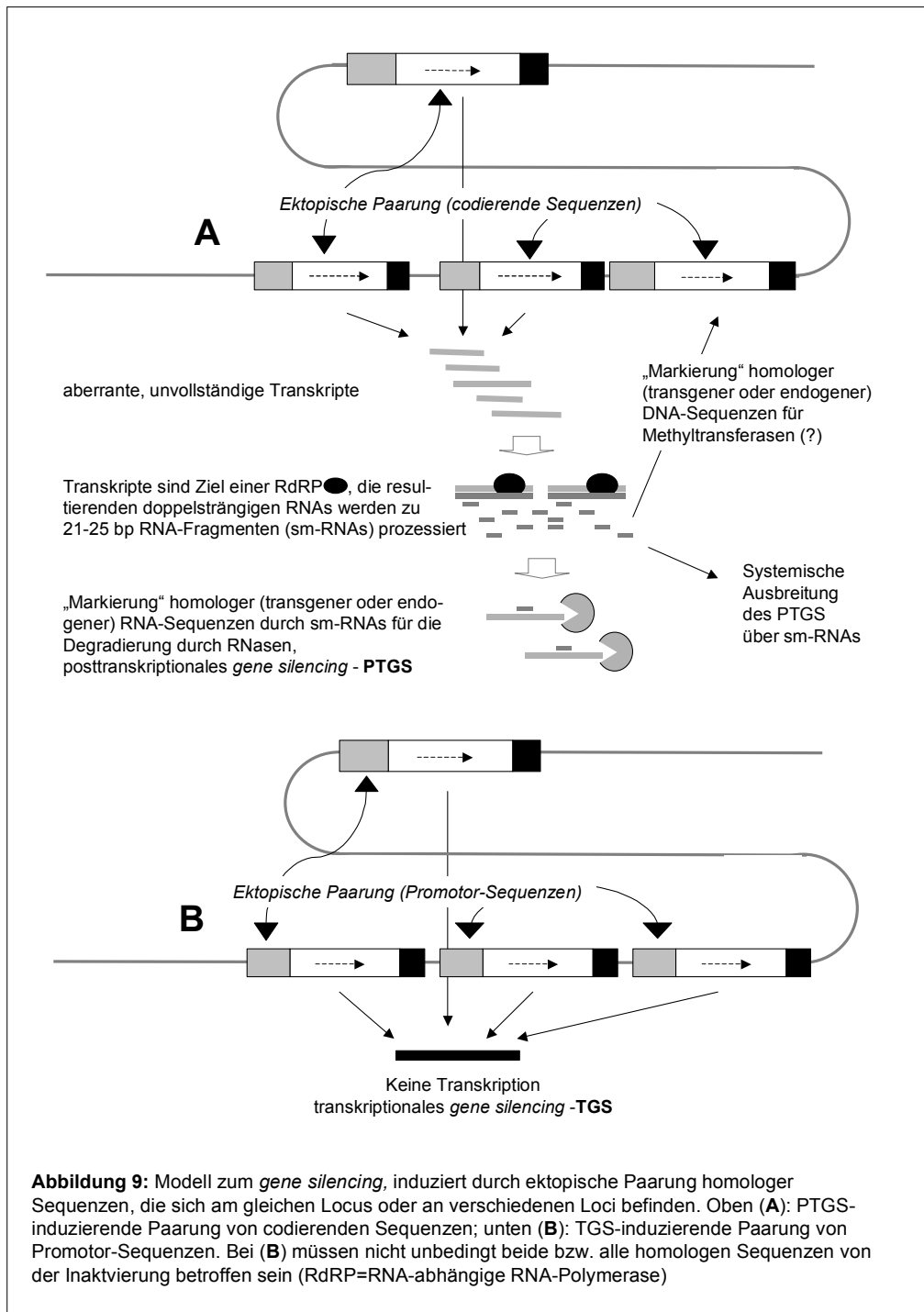
- Das *Threshold*-Modell (s. Abbildung 7) geht davon aus, dass Transkripte, deren Konzentration einen bestimmten Level übersteigen, degradiert werden (Lindbo und Dougherty 1992, Dougherty und Parks 1995, Waterhouse *et al.* 1999). Mit diesem Modell läßt sich die Inaktivierung von Genen erklären, die durch mehrfache Integration in vielen Kopien vorliegen, aber auch einzelne Gene, die eine sehr hohe Expression aufweisen (u.U. erst nach Erreichen des homozygoten Zustandes, s. Abschnitt 3.4.4). Der begriff *homology dependent gene silencing* trifft für letzteren Fall nicht zu. Das *Threshold*-Modell gehört deshalb, neben den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Einflüssen durch den genomischen Kontext, zu den Modellen, mit deren Hilfe sich auch *gene silencing*-Phänomene in Pflanzen mit nur einzelnen Kopien eines Transgens erklären lassen.



- Sequenzumlagerungen können die Bildung aberranter Transkripte verursachen (s. Abbildung 8, English *et al.* 1996, Hohn *et al.* 1996, Jones *et al.* 1998, Waterhouse *et al.* 1999, Wang und Waterhouse 2000). Nach Transkription von Genen, die in Form invertierter Sequenzwiederholungen integriert vorliegen (Abbildung 8A), entstehen selbstkomplementäre Transkripte, aus denen doppelsträngige RNA-Moleküle hervorgehen. Solche Transkripte können ein posttranskriptionales *gene silencing* eines homologen Gens mit hoher Effektivität induzieren, wie u.a. in der oben beschriebenen Untersuchung von Wang und Waterhouse (2000) gezeigt wurde. Die starke Wirkung doppelsträngiger RNA-Moleküle bei der Induktion des *gene silencing* wird bei der Methode des RNAi zur Gensuppression in tierischen Organismen genutzt (*RNA interference*, s. Fire 1999). Doppelsträngige RNA, die entweder in eine Zelle mikroinjiziert wird oder aus der Transkription gezielt konstruierter, invertierter Sequenzwiederholungen resultiert, verursacht ein sehr effektives *gene silencing*, im Gegensatz zu einzelsträngiger *Sense* oder *Antisense*-RNA, die nur geringe oder keine Wirkung zeigen. Invertierte Wiederholungen von Promotor-Sequenzen verursachen ein transkriptionales *gene silencing* von Genen mit homologen Promotoren (Mette *et al.* 2000).
- Auch multiple Insertionen kann bei ektopischer Paarung homologer Sequenzen zur Bildung aberranter, in diesem Fall unvollständiger Transkripte führen (s. Abbildungen 9 + 10). Die miteinander interagierenden Homologiebereiche können Erkennungssignale für Methylierungssysteme darstellen (Malagnac *et al.* 1997). Die Hypermethylierung codierender Regionen bewirkt einen vorzeitigen Abbruch der Transkription, während die Transkription bei Hypermethylierung des Promoterbereiches vollständig unterbunden wird. Homologien im Promotorbereich verursachen deshalb in der Regel ein transkriptionales

gene silencing, während homologe Bereiche codierender Sequenzen sowohl ein transkriptionales als auch ein posttranskriptionales *gene silencing* zur Folge haben können (Fagard und Vaucheret 2000a). Ektopische Paarungen homologer Sequenzen können zwischen benachbarten, aber auch zwischen weit voneinander entfernt im Genom lokalisierten Bereichen stattfinden. Von der Inaktivierung können sowohl beide als auch nur eine der beteiligten Sequenzen betroffen sein (Fagard und Vaucheret 2000), wobei es noch unklar ist, ob die Methylierung selbst eine Transkription verhindert oder einen Bereich des Genoms für einen anderen, inaktivierenden Mechanismus nur „markiert“.





Das durch ektopische Paarung induzierte *gene silencing* ist verwandt mit einem Phänomen, dass bereits vor mehreren Jahrzehnten in der klassischen Genetik beobachtet wurde, der Paramutation (Brink 1956, s. Chandler *et al.* 2000). Mit diesem Begriff wurde ein Vorgang beschrieben, der den Mendelschen Regeln zu widersprechen schien. Nach diesen Regeln segregieren Allele unabhängig voneinander. Nach Kreuzung verschiedener Maislinien wurde

jedoch ein Locus identifiziert, dessen Allele sich in ihrer Ausprägung gegenseitig beeinflussten konnten. Die Änderung der Ausprägung war vererbbar, aber nicht stabil und konnte nach einigen Generationen wieder zur ursprünglichen Ausprägung revertieren. Es handelte sich daher nicht um eine durch Mutation hervorgerufene Änderung der Basensequenz (daher *Paramutation*). Die *Paramutation* beruht allerdings auf einer allelischen, nicht auf einer ektopischen Interaktion.

Nach Waterhouse *et al.* (1999) stellen den *Threshold*-Level übersteigende sowie doppelsträngige bzw. aberrante Transkripte eine Matrize für die RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) dar. Diese vermag von sowohl einzel- als auch doppelsträngiger mRNA kurze (21-25 bp) RNA-Moleküle herzustellen, die erstmalig von Hamilton und Baulcombe 1999 nachgewiesen wurden. Die kurzen RNA-Moleküle binden ihrerseits wiederum an komplementäre RNA-Sequenzen und sollen diese hierdurch für den Abbau durch RNA-degradierende Enzyme markieren. Über die 21-25 bp- RNA-Fragmente kann sich darüber hinaus ein PTGS systemisch in der Pflanze ausbreiten. Die zentrale Rolle der RdRP beim posttranskriptionales *gene silencing* und die Existenz der kurzen RNA-Fragmente wurde inzwischen in mehreren Studien bestätigt (s. Paszkowski und Whitham 2001, Fagard und Vaucheret 2000a).

Die Literatur zum *homology dependent gene silencing* ist mit mehreren hundert Publikationen sehr umfangreich. Auf eine umfassende Dokumentation wurde in der vorliegenden Studie deshalb verzichtet. Hierfür sei auf die große Zahl an Reviews zu diesem Thema verwiesen (z.B. Paszkowski und Whitham 2001, Waterhouse *et al.* 1999, Fagard und Vaucheret 2000a, Kumpatla *et al.* 1998, s. auch den Sonderband von Plant Molecular Biology Vol. 43, Juni 2000).

3.4.4 Merkmalsverlust im homozygoten Zustand des Transgens

Primärtransformanten entsprechen genetisch den F1-Hybriden der Mendelschen Aufspaltungsregeln. Nach Selbstung einer Linie, die einen einzelnen transgenen Locus besitzt, spalten die Nachkommen der 2. Mendelschen Regel entsprechend genotypisch in 1 (homozygot für den transgenen Locus) : 2 (hemizygot¹⁰, wie die F1) : 1 (ohne transgenen Locus). 25% der Nachkommen tragen den transgenen Locus nun auf beiden homologen Chromosomen. Im Fall der über Samen zu vermehrenden Arten sind homozygote Linien für wissenschaftliche Untersuchungen und Pflanzenzüchtung wichtig, da nur sie eine einheitlich transgene Nachkommenschaft gewährleisten.

In vielen Untersuchungen (s. Tabelle 2) wurde allerdings festgestellt, dass Transgene bestimmter Linien im homozygoten Zustand inaktiviert werden. Der homozygote Zustand scheint allerdings nicht selbst der auslösende Faktor hierfür zu sein. Hinweise lieferten vor allem Experimente zur Co-Suppression endogener Sequenzen. Werden aus (diploiden)

¹⁰ Als hemizygot werden Linien bezeichnet, in denen ein Genort nur in einem der beiden homologen Chromosomen existiert.

transgenen Linien, die ein *silencing* im homozygoten, jedoch nicht im hemizygoten Zustand aufweisen, haploide Linien durch Antheren-Kultur künstlich erzeugt, so zeigen auch diese Pflanzen den gleichen *silencing*-Effekt. Es scheint demnach ein "Transgen-Dosis-Effekt" vorzuliegen, bei dem das Verhältnis des transgenen Locus zum Gesamtgenom eine entscheidende Rolle spielt (de Carvalho *et al.* 1992, Palauqui und Vaucheret 1995). Auch wenn die Regulation dieses Expressionsverlustes bislang nicht aufgeklärt werden konnte, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeiten das in Abschnitt 3.4.3 bereits erwähnte *Threshold*-Modell (Waterhouse *et al.* 1999). Es ist bekannt, dass homozygote Nachkommen mit 2 Kopien pro Genom eine höhere Genexpression aufweisen können als hemizygoten Nachkommen (Voss *et al.* 1995, Fecker *et al.* 1996, Van Houdt *et al.* 1997, Goossens *et al.* 1999, Zhong *et al.* 1999). Nach der Theorie des *Threshold*-Modells kommt es zur Degradation eines Transkriptes, wenn die Transkriptmenge einen bestimmten Level übersteigt (s. Abschnitt 3.4.3 und Abbildung 7).

Tabelle 2: Zunahme des *silencing*-Effektes nach Wechsel in den homozygoten Zustand

Empfänger spezies	Promotor	codierende Sequenz	Inhalt der Studie, Anmerkungen zu den instabilen Linien	Referenz
<i>Petunia hybrida</i>	35S ocs	<i>nptII</i> <i>nptII</i>	6 von 104 (hemizygoten) Linien zeigen eine 2:1 Aufspaltung, die die Autoren auf eine Inaktivierung der Gene im homozygoten Zustand zurückführen	Deroles und Gardner 1988a/1988 b
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>gn1</i> (β -1,3- Glucanase)	eine von 8 Linien mit einer einzelnen Kopie des Transgens zeigte Inaktivierung des <i>gn1</i> -Gens im homozygoten Zustand	de Carvalho <i>et al.</i> 1992
<i>Nicotiana sylvestris</i>	35S	<i>chn48</i> (Chitinase A)	eine Linie produziert im homozygoten Zustand geringere Mengen der Chitinase als im hemizygoten Zustand	Hart <i>et al.</i> 1992
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>csr1</i> (Herbizid- Resistenzgen aus <i>A. thaliana</i>)	alle hemizygoten Nachkommen einer Linie chlorsulfuron-resistent, 59% der homozygoten Nachkommen anfällig	Brandle <i>et al.</i> 1995
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S + <i>enhancer</i>	<i>nia2</i> -cDNA (Nitrat-Reduk- tasegen aus <i>N.</i> <i>tabacum</i>)	eine Linie mit vollständiger Suppression in sämtlicher Nachkommen im homozygoten Zustand, keine Suppression im hemizygoten Zustand	Vaucheret <i>et al.</i> 1995
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S + double enhancer	GUS	in 9 untersuchten Linien Suppression der GUS Aktivität in homozygoten Individuen nach ca. 4 Monaten, in hemizygoten Individuen nach ca. 12 Monaten	Elmayan and Vaucheret 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>gn1</i> (β -1,3- Glucanase)	eine Linie zeigt <i>silencing</i> des β -1,3-Glucanase Gens nur im homozygoten Zustand	Jacobs <i>et al.</i> 1997
<i>Oryza sativa</i>	<i>lpt2</i> (aleuron- spezifischer Promotor aus Gerste)	GUS	eine Linie zeigt Suppression der GUS-Aktivität in der Aleuronschicht nur im homozygoten Zustand	Morino <i>et al.</i> 1999

Bei Arten, die über Samen vermehrt werden, ist demnach eine Evaluierung der Stabilität der Genexpression auf homozygoter Ebene vorzunehmen. Vegetativ vermehrte Arten, wie z.B. Kartoffeln, Erdbeeren oder diverse Gehölzpflanzen verbleiben jedoch auf Dauer im hemizygoten Zustand, d.h. Instabilitäten aufgrund einer Änderung des Zygotiestatus müssen hier nicht problematisiert werden.

3.5 INSTABILITÄT DURCH PHYSISCHEN VERLUST DER TRANSGEN-SEQUENZEN

Im Vergleich zu der großen Zahl von Berichten über den Ausfall oder Veränderungen der Genexpression durch *gene silencing* sind nur sehr wenige Publikationen erschienen, in denen der Verlust des transgenen Merkmals auf Sequenzänderungen bzw. auf eine Deletion der transgenen Sequenz zurückgeführt wurde. Eine Zusammenstellung der bisher geschilderten Fälle zeigt Tabelle 3. Die Beispiele beschreiben Sequenzverluste sowohl in intakten Pflanzen als auch in Gewebekulturen.

Von den sechs Publikationen, die einen physischen Verlust (oder Veränderungen) der übertragenen Sequenzen in intakten Pflanzen beschreiben, berichten drei über einen „plötzlichen“ Verlust in vielen oder sämtlichen Nachkommen der zweiten oder dritten Samengeneration (Spencer *et al.* 1992, Register *et al.* 1994, Srivastava *et al.* 1996). Ulian *et al.* (1996) beobachteten bereits in der ersten Nachkommenschaft Veränderungen der T-DNA Struktur gegenüber derjenigen der entsprechenden Primärtransformanten. In sämtlichen Beispielen lag die Rate der Instabilität außerordentlich hoch. Jeweils eine von 4 (Srivastava *et al.* 1996), 6 (Spencer *et al.* 1992) oder 22 (Register *et al.* 1994) Linien zeigte den Gen-Verlust, die Sequenzveränderungen bei Ulian *et al.* (1996) traten sogar in den Nachkommen von 3 aus 4 untersuchten Linien auf.

Die hohe Frequenz, mit der physische Veränderungen der transgenen DNA-Sequenzen in diesen Arbeiten beschrieben werden, entspricht nicht der geringen Zahl an Publikationen, die über derartige Phänomene berichten. Über die Ursachen des Transgen-Verlustes lässt sich nur spekulieren, etwa „*the integration event was linked to a deleterious chromosome abnormality such as a small duplication or deletion and therefore transmitted at a low frequency*“ (Spencer *et al.* 1992) oder „*certain sites in the plant genome are not favourable for inheritable integration of foreign genes*“ (Srivastava *et al.* 1996). Möglicherweise könnte eine Integration in transpositionsaktive Bereiche stattgefunden haben. Mutationen oder Rekombinationsereignisse (mit einer Frequenz von 10^{-4} - 10^{-7} , s. Abschnitt 3.6) können hingegen nicht für den Merkmalsausfall verantwortlich sein. Auch besitzen solche Ereignisse keine in diesem Ausmaß vorhandene Spezifität für einzelne transgene Linien. Über Transgen-Verluste in gentechnisch veränderten Tabak-Linien berichtet auch Heberle-Boers *et al.* (1988), allerdings werden in dieser Publikation keine Daten präsentiert.

Tabelle 3: Transgen-Instabilität durch Sequenzveränderungen und/oder Deletionen

Empfänger spezie	Promotor	codierende Sequenz	Transformations-methode, Untersuchungs-material	Ergebnisse, Interpretationen	Referenz
<i>Nicotiana tabacum</i>	ocs (Octopin-Synthase)	T-DNA-Gene, ocs	<i>A. tumefaciens</i> , <i>in vitro</i> -Kultur eines <i>shooty crown gall</i> Tumors	ein einzelnes Sprossregenerat aus 3jähriger Dauerkultur des Tumors mit veränderter T-DNA-Struktur und Verlust der ocs-Sequenz	Peerbolte <i>et al.</i> 1987
<i>Nicotiana tabacum</i>	nos nos	<i>nptII</i> nos	<i>A. tumefaciens</i> 283 Linien, Segregationsanalysen durch Keimlingstests über drei Generationen	gelegentliche Instabilität der T-DNA (ohne weitere Angaben)	Heberle-Boers <i>et al.</i> 1988
<i>Solanum tuberosum</i>	-	T-DNA aus <i>A. rhizogenes</i>	<i>A. rhizogenes</i> , Sprossregenerate aus 6 transformierten Wurzel-Klonen, Langzeit- <i>in vitro</i> Kultur	eine von 6 Linien verlor die T-DNA Region nach längerer <i>in vitro</i> Kultivierung	Hänisch ten Cate <i>et al.</i> 1990
<i>Petunia hybrida</i>	nos gene2	<i>nptII</i> gene2	<i>A. tumefaciens</i> 31 Primär-Transformanten, <i>in vitro</i> Material	durch Negativ-Selektion wird auf Expressionsverlust selektiert – von 31 Linien zeigten 30 Methylierungen im betroffenen Gen, in einer Linie hatte eine Deletion des Gens stattgefunden	Renckens <i>et al.</i> 1992
<i>Zea mays</i>	35S 35S- <i>adh1</i>	<i>bar</i> GUS	Partikel-Kanone 4 Linien über zwei Generationen	Verlust in den meisten T2-Nachkommen in einer der 4 Linien	Spencer <i>et al.</i> 1992
<i>Zea mays</i>	35S 35S	<i>nptII</i> GUS	Partikel-Kanone 22 Linien über 3 Generationen	eine von 22 Linien zeigt nach 3 stabil exprimierenden Generationen Verlust der Sequenzen in fast sämtlichen Nachkommen	Register <i>et al.</i> 1994
<i>Triticum aestivum</i>	Ubi1 (Ubiquitin-Promotor) + Exon1/ Intron1	<i>bar</i> GUS	Partikel-Kanone 6 Linien über mehrere Generationen	in einer Linie Verlust der Sequenz in sämtlichen Nachkommen der T3	Srivastava <i>et al.</i> 1996
<i>Petunia hybrida</i>	nos 35S	<i>nptII</i> GUS	<i>A. tumefaciens</i> 4 Linien, 1. Nachkommenschaft (T1)	bei 3 der 4 Linien zeigt jeweils eine von 5 untersuchten Individuen Veränderungen der T-DNA-Struktur in der T1	Ulian <i>et al.</i> 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	34S T-cyt nos	<i>codA</i> GUS <i>bar</i>	<i>A. tumefaciens</i> Kallus-Linien, Untersuchung zur homologen Rekombination	20% der Kallus-Linien mit Verlust der transgenen Loci durch intrachromosomale, somatische Rekombinationsereignisse	Risseeuw <i>et al.</i> 1997
<i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i> Hybride	35S nos	<i>rolC</i> <i>nptII</i>	<i>A. tumefaciens</i> 14 Linien, vegetativ vermehrte Primär-transformanten	eine Linie mit stochastischem Expressionsverlust Verlust der Expression durch Deletion des <i>rolC</i> -Gens, intrachromosomale Rekombination aufgrund der speziellen Locus-Struktur dieser Linie (invertierte Sequenzwiederholung)	Fladung 1999

Die bisher erwähnten Beispiele beschreiben meiotische Instabilitäten. Den Fall einer mitotischen Instabilität schildert Fladung (1999). Unter 14 Pappel-(Primär)Transformanten wurde eine Linie gefunden, in der das *ro/C* Gen (s. Abschnitt 3.3) in einzelnen Zellen unter Gewächshausbedingungen stochastisch eliminiert wurde. Die Ergebnisse einer detaillierten Analyse des transgenen Locus dieser Linie ließen Fladung vermuten, dass möglicherweise die Existenz einer invertierten Sequenzwiederholung die relativ häufige Deletion des Transgens verursacht. Solche intrachromosomalen Rekombinationsereignisse wurden bereits in mehreren Studien beschrieben, allerdings mit einer sehr viel geringeren Frequenz als in der von Fladung beschriebenen Linie (s. Abschnitt 3.6).

Vier der in Tabelle 3 aufgelisteten Publikationen (Peerbolte *et al.* 1987, Hänisch ten Cate *et al.* 1990, Renckens *et al.* 1992, Risseuw *et al.* 1997) beschreiben Untersuchung, in denen der Merkmalsverlust in Kalluskulturen¹¹ oder in aus solchen Kulturen stammenden Sprossregeneraten beobachtet wurde. Es ist seit längerem bekannt, dass Kalluskulturen starken genetischen und epigenetischen Veränderungen, wie chromosomalen Veränderungen, Rekombinationen, Mutationen, *gene silencing*, Aktivierung von Retroelementen und springenden Genen, unterliegen können (somaklonale Variation, s. Kaeppler *et al.* 2000). Da in Gewebekulturen, die auf der Proliferation von dedifferenzierten Kalluszellen basieren, sehr viel mehr Zellen an der Bildung neuer Gewebe beteiligt sind als in intakten Pflanzen, können sich genetische Aberrationen bei längerer Kulturdauer anreichern. Dies ist zu beachten, wenn transgene Linien über solche dedifferenzierten Stadien propagiert und anschließend zu Sprossen regeneriert werden. Dass Sprossregenerate aus solchen Kulturen Veränderungen in der Struktur des transgenen Locus gegenüber den Ausgangslinien aufweisen können, zeigten Peerbolte *et al.* (1987). Häufiger traten Instabilitäten in der Merkmalsausprägung in den von Hänisch ten Cate (1990) beschriebenen Kartoffelkulturen auf, in denen eine von insgesamt sechs Linien einen Sequenzverlust der übertragenen Sequenzen aus *Agrobacterium rhizogenes* aufwies. Es ist bekannt, dass genetische Veränderungen in geringerem Maße auftreten, wenn die *in vitro*-Vermehrung über Meristemkulturen erfolgt (Goto *et al.* 1998).

Renckens *et al.* (1992) versuchten über eine *negativ-Selektion* Transposons in *Petunia hybrida* zu „fangen“¹². Hierzu wurden transgene Petunien hergestellt, die aufgrund der Expression eines Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* bei entsprechendem Angebot bestimmter Vorstufen toxische Mengen eines Auxins produzierten und nur im Falle einer Inaktivierung des Transgens überleben konnten. Die Wissenschaftler hofften, dass eine solche Inaktivierung durch die Insertion eines Transposons in die codierende Sequenz des Gens erfolgt. Ein solches Ereignis würde die Isolierung und Analyse des Transposons ermöglichen. Nach Selektion von 31 überlebenden Klonen stellte sich allerdings heraus, dass in 30 dieser Klone das entsprechende Transgen in seiner Sequenz unverändert war, jedoch an vielen Stellen Methylierungen aufwies

¹¹ in dedifferenzierter Form wachsende pflanzliche Gewebekulturen

¹² s. hierzu auch das Petunienexperiment von Meyer *et al.* (1992), Abschnitt 3.11.1

und offensichtlich durch epigenetische Faktoren an der Expression gehindert wurde. Im verbleibenden Klon hatte dagegen eine Deletion der codierenden Sequenz stattgefunden (ein „gefangenes“ Transposon wurde in keiner der Linien gefunden). Auch wenn das Verhältnis von 30:1 nicht als repräsentativ gelten kann, zeigt diese Studie zumindest, dass der physische Verlust transgener Sequenzen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorkommt, jedoch im Vergleich zu einem Expressionsverlust durch epigenetische Mechanismen eine eher seltenere Variante der Transgen-Instabilität darstellt.

Von einer besonders hohen physischen Instabilität von *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA-Sequenzen in protoplastenbürtigen-Kalluskulturen transformierter Tabak-Linien berichten Risseeuw *et al.* (1997). In dieser Studie wurde versucht, Transformanten mittels negativ-Selektion zu identifizieren, in denen eine Integration der T-DNA über homologe Rekombination stattgefunden hat. Hierzu waren zunächst Linien hergestellt worden, die ein aus *E. coli* stammendes Gen für eine Cytosin-Deaminase enthielten. Die negativ-Selektion basiert auf der Aktivität dieses Enzyms bei der Umwandlung des nicht-toxischen 5-Fluorocytosins in 5-Fluorouracil, der Vorstufe der toxischen Substanz 5-Fluoro-dUMP. Aus Blättern dieser Linien wurden Protoplasten hergestellt und über den direkten Gentransfer erneut transformiert. Bei Selektion auf 5-Fluorocytosin-haltigem Medium konnten nur solche Klone überleben, die das Deaminase-Gen verloren hatten. Dies geschah allerdings nur sehr selten durch homologe Rekombinationsereignisse, sondern in der Regel aufgrund einer Deletion des im ersten Transformationsexperimentes erzeugten T-DNA-Locus. Anders als Renckens *et al.* (1992) fanden Risseeuw *et al.* nicht vornehmlich durch epigenetische Mechanismen stillgelegte Loci. Risseeuw *et al.* führen die häufigen Deletionen auf somatische, intrachromosomale Rekombinationsereignisse zwischen Mikrohomologien von wenigen Basenpaaren zurück und vermuten eine besondere Instabilität der durch *A. tumefaciens* erzeugten T-DNA-Loci unter Gewebekulturbedingungen, jedoch nicht in intakten Pflanzen.

Während die Ursachen für die oben geschilderten Fälle von meiotischen, physischen Instabilitäten transgener Sequenzen in intakten Pflanzen (Spencer *et al.* 1992, Register *et al.* 1994, Srivastava *et al.* 1996) unbekannt sind, können die Beispiele des Transgen-Verlustes in Kalluskulturen auf Mutationen und/oder somatische Rekombinationsvorgänge zurückgeführt werden, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden. Solche Ereignisse bleiben in intakten Pflanzen in der Regel unbemerkt, reichern sich hingegen, wie bereits erwähnt, in Kalluskulturen an und können sich in bestimmten Zelllinien etablieren. Die *in vitro*-Verklonung transgener Linien über Kalluskulturen bzw. dedifferenzierte Stadien ist deshalb hinsichtlich der Stabilität transgener (wie auch endogener) Merkmale mit einem Risiko behaftet.

3.6 INSTABILITÄT DURCH INTRACHROMOSOMALE REKOMBINATION UND MUTATION

Der Inhalt dieses Abschnitts schließt direkt an einige der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Beispiele an, in denen der Verlust der Transgen-Sequenzen auf somatische, intrachromosomale Rekombinationsereignisse zurückgeführt wurde. Intrachromosomale Rekombinationen und Mutationen stellen niedrigfrequente Ereignisse dar, die zur natürlichen genetischen Variabilität beitragen und den Verlust (nicht nur) transgener Merkmale durch Sequenzveränderungen und/oder -deletionen verursachen können. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass sich derartige Ereignisse in Kalluskulturen anreichern und etablieren können.

Dass intrachromosomale Rekombinationsvorgänge, aus denen Sequenzdeletionen resultieren können, auch in somatischen Zellen intakter Pflanzen stattfinden, haben u.a. Puchta *et al.* (1995b) experimentell nachweisen können. Hierzu wurden zwei Teilsequenzen des bereits erwähnten Reportergens GUS hergestellt: eine, in der das letzte Drittel (GU) und eine weitere, deren vorderes Drittel deletiert wurde (US). Beide Sequenzen wurden anschließend in einen geeigneten Transformationsvektor kloniert, wobei beide Teilsequenzen durch eine Hygromycinresistenz-vermittelnde Genkassette (HYG) getrennt wurden (Promotor-GU-HYG-US-Terminator). Nach Übertragung dieses Konstruktes in Pflanzen erfolgt eine GUS-Expression nur dann, wenn interne, homologe Rekombinationsereignisse (zwischen U-U) stattgefunden haben, durch die das „zerlegte“ GUS-Gen, bei gleichzeitiger Deletion des Hygromycin-Resistenzgens, wieder „repariert“ wurde. Mit Hilfe dieses Systems wiesen Puchta *et al.* in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* nach, dass solche Rekombinationsvorgänge in sämtlichen Entwicklungsphasen der Pflanze stattfinden und unter Stressbedingungen (UV, Salzstress) unter Umständen ansteigen können. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Rekombinationsrate in unabhängigen Transformanten unterschiedlich ausgeprägt sein kann, d.h. durch die Struktur des transgenen Locus und/oder den Integrationsort offensichtlich beeinflusst wird (Puchta *et al.* 1995b, Ries *et al.* 2000).

Die Frequenz solcher Rekombinationsvorgänge liegt zwischen 10^{-4} und 10^{-7} pro Zellteilung (Peterhans *et al.* 1990, Gal *et al.* 1991, Assaad und Signer 1992, Lebel *et al.* 1993, Swoboda *et al.* 1994, Puchta *et al.* 1995a).

Die mit Hilfe transgener *Arabidopsis*-Linien ermittelte Rate somatischer Mutationen in Pflanzen liegt bei 10^{-6} - 10^{-7} pro Basenpaar und Generation (Kovalchuk *et al.* 2000). Ausgehend von einer durchschnittlichen Länge eines Gens von ca. 1000 bp ist mit einem Ausfall der Funktion in einer Größenordnung von 10^{-4} - 10^{-6} zu rechnen. Eine Abhängigkeit der Mutationsrate vom Integrationsort des Transgens beschreiben ebenfalls Kovalchuk *et al.* (2000), und bestätigen damit die schon ältere Erkenntnis, dass die Mutationsrate zwischen verschiedenen Loci im Genom eines Organismus differieren kann (Wolfe *et al.* 1989, Lichtenauer-Kaligis *et al.* 1996).

Eine Weitergabe genetischer Veränderungen an die Nachkommen ist möglich, wenn gametenbildende Zellen des Sprossmeristems betroffen sind. Die Weitergabe von intrachromosomalen Rekombinationsereignissen an die Nachkommen ist bereits mehrfach nachgewiesen worden (Assaad und Signer 1992, Ries *et al.* 2000). In der Studie von Ries *et al.* (2000), in der das bereits oben beschriebene GUS-System zur Detektion von Rekombinationsereignissen in *Arabidopsis thaliana* benutzt wurde, finden sich Frequenzen von $4\text{-}8 \times 10^{-6}$. Da Sequenzwiederholungen, die denjenigen in dem von Puchta *et al.* (1995b) beschriebenen GUS-Konstrukt zumindest ähneln, in vielen Transformationsvektoren enthalten sind und darüber hinaus natürliche Sequenzwiederholungen in pflanzlichen Genomen gehäuft auftreten, dürften Deletionen transgener Sequenzen in dieser Häufigkeit vorkommen. Da es sich im Fall der z.B. von Assaad und Signer (1992) und Ries *et al.* (2000) benutzten Modellsysteme um Rückmutationen bzw. um die Reparatur von codierenden Sequenzen handelt, liegt die Wahrscheinlichkeit des umgekehrten Vorgangs, der Zerstörung der Funktion eines Gens, etwa um den Faktor 10 höher. Annäherungsweise in diesem Bereich befindet sich die Expressionsverlustrate des *npftII*-Gens in transgenen Tabaklinien (Conner *et al.* 1998). Der Verlust wird in diesem Fall von den Autoren auf Rekombinationsereignisse zurückgeführt (s. auch Abschnitt 3.12).

Durch epigenetische Faktoren bedingte Instabilitäten kommen zweifelsohne weitaus häufiger vor. Es wäre jedoch falsch, die Bedeutung genetischer Veränderungen zu vernachlässigen, denn auch bei allen Anstrengungen zur Vermeidung von *silencing*-Effekten durch diverse Strategien bleiben Mutations- und Rekombinationsereignisse als Ursache für einen Expressionsverlust bestehen. Dies ist insbesondere bei langlebigen Organismen wie z.B. Gehölzpflanzen zu berücksichtigen, in denen sich, anders als bei ein- oder zweijährigen Arten, solche Sequenzveränderungen über viele Jahre und Jahrzehnte anreichern können.

3.7 INSTABILITÄT DURCH VERWENDUNG DES CAMV35S-PROMOTORS?

Der 35S-Promotor war die erste in Pflanzen aktive regulatorische 5'-Sequenz, die identifiziert und charakterisiert wurde (Covey *et al.* 1981). Er ist Bestandteil des CaMV (Blumenkohlmosaik-Virus)-Genoms und ist mit Abstand der am häufigsten in der „grünen“ Gentechnik verwendete Promotor. Das CaMV gehört zu den Pararetroviren, d.h. es befällt die pflanzlichen Zellen als ein von einem Capsid umhüllter DNA-Strang, der im Kern der Zelle in RNA-Moleküle mit unterschiedlichen Funktionen umgeschrieben wird. Nach Verlassen des Kerns dienen diese RNA-Moleküle (i) als Boten-RNA zur Herstellung von Capsid-Proteinen, (ii) als Boten-RNA für eine reverse Transcriptase und (iii) als Matrize für die reverse Transkriptase zur Produktion neuer viraler DNA-Moleküle (Covey und Al-Kaff 2000). Der 35S-Promotor ist verbreitet, nicht nur weil er als ziemlich starker Promotor gilt, d.h. eine hohe Expression eines Resistenzmarkers oder des *gene of interest* verspricht, sondern auch aufgrund der Verfügbarkeit, da man ihn in

unzähligen Vektoren und Genkassetten findet. Der 35S-Promotor gilt darüber hinaus als konstitutiv, d.h. die Gene, die unter seiner Kontrolle stehen, sollten in allen Zellen der genetisch veränderten Pflanze exprimiert werden. Auch wenn dies nicht immer der Fall ist (z.B. Plegt und Bino 1989), so lässt sich doch immerhin davon ausgehen, dass er zumindest in vielen Zelltypen aktiv ist.

Die häufige Erwähnung des 35S-Promotors in Berichten über die Instabilität von Transgenen beruht möglicherweise jedoch nicht ausschließlich auf seiner weiten Verbreitung. In Arbeiten von Jorgensen (1995), Elmayan and Vaucheret (1996), English *et al.* (1996) und Que *et al.* (1997) wird darauf hingewiesen, dass es gerade die hohe Transkriptionsaktivität des 35S-Promotors sein könnte, die ein (posttranskriptionales) *gene silencing* auslöst. Die Akkumulation von transkribierten RNA Molekülen über einen bestimmten Level hinaus (*Threshold*-Modell, s. Waterhouse *et al.* 1999 und Abschnitt 3.4.3) gehört in die von vielen Wissenschaftlern favorisierte Gruppe von Faktoren, die an der Initiierung des *gene silencing* beteiligt sind.

Über einen höheren Grad der Instabilität des 35S-Promotors im Vergleich zu einem Plastocyanin-Promotor (*pet A*) aus *Pisum sativum* berichten McCabe *et al.* (1999). Nach Übertragung des *bar*-Gens (Herbizidtoleranz) jeweils unter Kontrolle der beiden Promotoren in *Lactuca sativa* ergab ein Screening der Nachkommenschaft von 163 (35S) bzw. 30 (*petE*) unabhängigen transgenen Linien über drei Generationen einen zunehmenden Verlust der Herbizidtoleranz in den 35S-Linien, während die *petA*-Linien einen nur geringen Ausfall des Merkmals aufwiesen. Die Autoren weisen allerdings daraufhin, dass dieser Unterschied nicht notwendigerweise auf ein erhöhtes *silencing* des 35S-Promotors zurückgeführt werden muss. Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass der *petE*-Promotor in *Nicotiana tabacum* eine im Vergleich zum 35S-Promotor weitaus stärkere Reporterexpression bewirkt (Pwee und Gray 1993). Falls eine entsprechende Situation bezüglich der Expression des *bar*-Gens in *Lactuca sativa* vorliegt, kann sich bei gleicher Inaktivierungsrate beider Genkassetten der gleiche phänotypische Unterschied zeigen, wenn die 35S-gesteuerte Expression des *bar*-Gens unterhalb des Levels fällt, der zur Ausprägung der Herbizidtoleranz notwendig ist. Untersuchungen zur Akkumulation des entsprechenden Enzyms wurden von McCabe *et al.* (1999) jedoch nicht durchgeführt.

Bellucci *et al.* (1999) verglichen die Expression eines schwefelreichen Zein-Gens aus *Zea mays* (G1L) unter Kontrolle des *rbcs*-Promotors (*rbcs*=codierende Sequenz der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase) und des 35S-Promotors. Auch diese Untersuchung präsentiert Daten, die auf eine geringere Stabilität von Transgenen hinweisen, deren Expression durch den 35S-Promotor kontrolliert wird, während andererseits die *rbcs*-Linien höhere G1L-Transkript-Mengen aufwiesen als die 35S-Linien (und damit der Theorie eines „zu starken“ 35S-Promotor widersprechen). Die instabilen 35S-Loci wiesen in dieser Untersuchung insgesamt einen höheren Methylierungsgrad auf als die *rbcs*-Loci. Bellucci *et al.* berichten darüber hinaus, dass aus Transformationsexperimenten, in denen das 35S-Konstrukt

verwendet wurde, ein höherer Anteil von Linien mit Integrationen multipler Kopien hervorgeht. Die Daten sind allerdings nicht signifikant.

Der 35S-Promotor soll darüber hinaus mehrere Rekombinations-*hotspots* besitzen, aus denen laut Kohli *et al.* (1999), Fu *et al.* (2000a) und Kumpatla und Hall (1999) Strangbrüche sowie Duplikationen resultieren können, die die Anfälligkeit des gesamten Locus für epigenetische Suppressionsmechanismen erhöhen. In Zusammenhang mit seiner viralen Herkunft sind noch folgende Aspekte zu beachten: (i) die in Verbindung mit Pathogen-Abwehrreaktionen in Pflanzen gebildete Salicylsäure erhöht die Transkriptionsaktivität des 35S-Promotors (Qin *et al.* 1994), (ii) in CaMV-sensitiven Pflanzenarten wie Raps kann ein durch den 35S-Promotor kontrolliertes Transgen durch eine CaMV-Infektion einem *homology dependent gene silencing* unterliegen (Al-Kaff *et al.* 2000, s. Abschnitt 3.11.2).

Über den 35S-Promotor sind mehr Details als über jede andere, in Pflanzen aktive 5'-regulatorische Sequenz bekannt – insofern ist es nicht überraschend, dass sich darunter einige befinden, die „negative“ Eigenschaften betreffen. Die erfolgreiche Verwendung des 35S-Promotors in vielen Untersuchungen belegt zweifelsohne, dass er eine stabile Expression von Transgenen gewährleisten *kann*. Andererseits ist die sehr geringe Anzahl an Veröffentlichungen, in denen über ein *silencing* von durch pflanzeneigene Promotoren kontrollierten Genen berichtet wird (z.B. Brusslan und Tobin 1995/cab140 in *A. thaliana*, Furner *et al.* 1998/Chalconsynthase-Promotor in *A. thaliana*, Itoh *et al.* 1997/waxy-Promotor in Reis), im Vergleich zum 35S-Promotor auffällig.

3.8 EINFLUSS DER TRANSFORMATIONSMETHODE AUF DIE EIGENSCHAFTEN DES TRANSGENEN LOCUS

Der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer und der direkte Gentransfer mit Hilfe der Partikel-Kanone stellen die zur Zeit wichtigsten Transformationsmethoden dar. Der Vorteil des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers wird darin gesehen, dass die Anzahl der übertragenen Kopien bei dieser Methode relativ niedrig ist (s. Gheysen *et al.* 1998). Der Anteil der Linien mit nur einer Kopie liegt bei etwa 10% (Meyer 1995), d.h. die Identifizierung von Linien mit transgenen Loci von geringer Komplexität ist vergleichsweise unproblematisch, wenn eine ausreichend grosse Zahl transgener Linien für die Auslese zur Verfügung steht. Bei Verwendung direkter Gentransfer-Methoden, in denen in der Regel mit vollständigen Plasmiden gearbeitet wird, entstehen dagegen sehr komplexe Loci (z.B. Hiei *et al.* 1994, Morino *et al.* 1999), die eine höhere Instabilität aufweisen.

Für die meisten monocotylen (zu denen die wirtschaftlich wichtigen Getreidearten gehören) und verschiedene dicotyle Arten ist der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer nur bedingt anwendbar, da *Agrobacterium tumefaciens* zum einen wirtsspezifisch ist und zum anderen nicht

alle Gewebe¹³ mit gleicher Effektivität infiziert. Während der letzten Jahre gelang es einigen Arbeitsgruppen, spezielle *in vitro*-Bedingungen, unter denen Gewebe verschiedener Getreidearten durch *Agrobacterium* infiziert werden konnten, zu ermitteln. Auf dieser Basis entstanden Transformationssysteme für Reis (Hiei *et al.* 1994), Gerste (Tingay *et al.* 1997) und Weizen (Cheng *et al.* 1997). Allerdings sind diese Systeme nicht leicht zu reproduzieren, so dass die Verwendung direkter Gentransfer-Methoden wie der Partikel-Kanone zur genetischen Manipulation von Getreiden aktuell geblieben ist. In diesen Fällen ist bei Einsatz der bisher üblichen Plasmidpräparationen zur Transformation ein hoher Anteil an Linien mit komplexen Loci in Kauf zu nehmen. Die Berichte über Transgen-Instabilitäten sind bei diesen Pflanzenarten deshalb besonders zahlreich. Eine umfassende Zusammenstellung mit detaillierten Angaben zu den einzelnen Untersuchungen befindet sich bei Iyer *et al.* (2000).

In diesem Zusammenhang soll nochmals die Untersuchung von Fu *et al.* (2000b) erwähnt werden, in der nur kurze, lineare DNA-Fragmente für die Reis-Transformation mit Hilfe der Partikel-Kanone benutzt wurden. Die auf diese Art und Weise erzeugten transgenen Loci wiesen eine geringere Komplexität auf als diejenigen aus Vergleichsexperimenten, in denen mit vollständigen Plasmiden transformiert wurde. Hieraus ergibt sich ein Vorteil der *direkten* Transformationsmethoden, bei denen im Gegensatz zum *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer keine Notwendigkeit für den Einsatz vollständiger Vektoren besteht. Auf die Tatsache, dass Vektor-Sequenzen z.T. mit hoher Frequenz zusammen mit der T-DNA im *Agrobacterium*-vermittelten-Gentransfer übertragen werden und, neben anderen Nachteilen wie z.B. der Integration von bakteriellen Selektionsmarkern, die Stabilität der Genexpression vermindern können, wurde in Abschnitt 3.4.2 bereits hingewiesen.

Einfluss auf den Komplexitätsgrad der erzeugten Loci können beim *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer darüber hinaus auch die verwendeten Bakterienstämme (Nopalinstämme vs. Octopinstämme; Jorgensen *et al.* 1987), der Gewebetyp, der für die Transformation eingesetzt wird (Grevelding *et al.* 1993) sowie die Transformationsbedingungen selbst besitzen (De Neve *et al.* 1997).

Für schwer transformierbare Arten besteht unabhängig von der eingesetzten Transformationsmethode das Problem, dass sich prinzipiell nur eine geringe Anzahl von Primärtransformanten produzieren lässt, d.h. nur kleine Populationen transgener Klone zur Selektion stabiler Linien zur Verfügung steht. In diesen Fällen sind Strategien von Bedeutung, mit deren Hilfe die Komplexität der entstehenden Loci reduziert werden kann. Neben der oben bereits erwähnten Studie von Fu *et al.* (2000b) zählt hierzu die Verwendung des PARP¹⁴-Inhibitors Niacinamid, dessen Anwesenheit während des Transformationsvorgangs zu einer Anreicherung von Linien mit geringer Kopienzahl geführt hat (De Block 1997) und der Ansatz von Srivastava *et al.* (1999, 2001), in dem durch eine Kombination der zu übertragenden

¹³ bei einigen Arten gelingt die Regeneration von Sprossen nur aus jungen oder meristematischen Geweben, die sich weniger gut für die Transformation mit *A. tumefaciens* eignen.

¹⁴ polyADP-Ribose-Polymerase, ein Enzym des DNA-Reparatursystems (de Murcia *et al.* 1994)

Sequenzen mit flankierenden *lox*-Erkennungsstellen *single-copy*-Linien mit hoher Effektivität erzeugt werden konnten.

3.9 EINFLUSS DES GENETISCHEN HINTERGRUNDES DES EMPFÄNGERORGANISMUS AUF DIE MERKMALSSTABILITÄT EINES TRANSGENS

3.9.1 Bedeutung phylogenetischer Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerorganismus

Aus Sicht des Anwenders besteht in der Möglichkeit, Artbarrieren überbrücken zu können, ein großes Potenzial. Das DNA-Molekül wird als *universeller* genetischer Code (fast) aller Lebensformen bezeichnet – im Prinzip korrekt, allerdings können DNA-Sequenzen Eigenschaften besitzen, die auf posttranskriptionaler und/oder translationaler Ebene zu Problemen bei der Expression in einer heterologen Wirtspflanze führen (s. Koziel *et al.* 1996). Verantwortlich sind hierfür auf posttranskriptionaler Ebene z.B. unterschiedliche Regulationsmechanismen bei der RNA-Prozessierung, wie abnormales *splicing* (Haseloff *et al.* 1997), vorzeitige Polyadenylierung (Jarvis *et al.* 1997), mRNA-Instabilität (Murray *et al.* 1991) oder Unterschiede *im codon usage* zwischen Spender- und Empfängerorganismus (Perlak *et al.* 1991), auf translationaler Ebene eine erhöhte Rate von Aminosäure-Substitutionen oder Leserasterverschiebungen durch fehlerhafte Bindung der Aminoacyl-tRNA (Kurland und Gallant 1996, Barak *et al.* 1996).

Probleme auf posttranskriptionaler Ebene werden mit einem hohen AT-Gehalt der codierenden Bereiche in Verbindung gebracht, nach Luehrsen und Walbot (1994) stellen AU-reiche Motive der mRNA Prozessierungssignale dar. In Anbetracht der Unterschiede, die bezüglich der Regulation der RNA-Prozessierungsmechanismen zwischen verschiedenen Organismen bestehen, ist es nicht überraschend, dass es im Fall der Expression eines Transgens in einem heterologen System aufgrund spezifischer Sequenzeigenschaften zu einer Blockierung oder einer Verringerung der Genexpression kommen kann.

Derartige Schwierigkeiten traten z.B. wiederholt bei der Expression von Bt¹⁵-Toxingenen in Pflanzen auf. In den ersten Untersuchungen zur Expression von nativen Bt-Toxingenen wurden sehr niedrige mRNA-Level und infolgedessen eine für Anwendungszwecke nur unzureichende Proteinakkumulation festgestellt (Barton *et al.* 1987, Vaeck *et al.* 1987). In späteren Studien wurde die Existenz von „abnormalen“ Prozessierungssignalen in der Bt-Sequenz nachgewiesen, die ein fehlerhaftes *splicing* (van Aarssen *et al.* 1995) und einen mRNA-Abbau (Murray *et al.* 1991, De Rocher *et al.* 1998) verursachten. Diehn *et al.* (1998) berichten darüber hinaus über eine frühzeitige Polyadenylierung des cry1A(c)-Bt-Toxings. Gelöst wurden diese

¹⁵ *crystal protein*-Gene aus *Bacillus thuringiensis*

Probleme durch die Herstellung synthetischer Versionen der Gene mit erhöhtem GC-Gehalt (Perlak *et al.* 1993, Iannaccone *et al.* 1997).

Elomaa *et al.* (1995) beschreiben Transformationsexperimente, in denen weißblühende Petunien mit dem A1-Gen aus *Zea mays* und dem *gdf*-Gen aus *Gerbera* unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors transformiert wurden. Beide Gene codieren für das Enzym Dihydroflavonol-4-Reduktase, dessen Aktivität eine lachsrosa Blütenfarbe (Pelargonidin) in den transgenen Linien bewirkt. Die Gene wurden jeweils in den gleichen Transformationsvektor kloniert, um Einflüsse durch spezifische Vektoreigenschaften auszuschließen. Alle erzeugten Linien produzierten in ihren Blüten mehr oder weniger große Mengen Pelargonidin. Zwischen den A1- und *gdf*-Linien ergaben sich jedoch phänotypische Unterschiede: Die Blüten der A1-Transformanten waren häufig blass und variabel bezüglich der Pigmentierung, während die Blüten der *gdf*-Transformanten durchgehend intensiv und stabil gefärbt waren. Die Instabilität der Blütenfärbung in den A1-Linien war mit Methylierungen sowohl des 35S-Promotors als auch der codierenden Region assoziiert. Im Fall der *gdf*-Linien wurden vereinzelt Methylierungen im Promotor gefunden, jedoch keine in der *gdf*-codierenden Sequenz. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Eigenschaften des A1-Gens selbst verantwortlich für das bevorzugte *silencing* sein müssen. Die aus der dikotylen Gattung *Gerbera* stammende *gdf*-Sequenz besitzt möglicherweise eine größere Kompatibilität zum Genom der Petunie und wird von diesem „akzeptiert“. Das GC-reiche A1-Gen aus *Zea mays* (die monokotylen Gräser besitzen einen höheren GC-Gehalt als dikotyle Arten) wird hingegen als fremd identifiziert und „stillgelegt“.

Die zu Beginn dieses Abschnittes erwähnten Beispiele zur Expression von Bt-Sequenzen in Pflanzen werden in der Regel nicht in die Kategorie *Transgen-Instabilität* eingeordnet. In diesem Fall beruht die unzureichende Expression des Gens auf Regulationsprozessen, die frühzeitig erkannt und durch spezifische Veränderungen der betreffenden Sequenzen umgangen bzw. dem Empfängerorganismus „angepasst“ wurden. Die Untersuchung von Elomaa *et al.* (1995) wird hingegen häufig in Publikationen zum Thema *gene silencing* zitiert, wohl auch deshalb, weil hier offensichtlich ebenfalls epigenetische Mechanismen eine Inaktivierung des A1-Gens verursachen. Andererseits besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den auf „zufälligen“ Ereignissen (Position und Locus-Struktur) beruhenden *gene silencing*-Effekten (s. Abschnitt 3.4.1), die in jeder transgenen Linie unterschiedlich ausgeprägt sind, und der in *allen* von Elomaa *et al.* beschriebenen Petunien-Linien starken Inaktivierung des A1-Gens. Auch ohne dass bislang eine Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen stattgefunden hat, lässt sich feststellen, dass hier eine generelle Regulation vorliegt, von der sämtliche Linien, wie auch im Fall der Expression des Bt-Toxin-Gens, betroffen sind, und dass diese mit dem genetischen Hintergrund des Empfängerorganismus in Verbindung steht.

Ein Beispiel, das unter Umständen ebenfalls dieser Kategorie entspricht, beschreiben Köhne *et al.* (1998). In diesem Fall erfolgt eine Inaktivierung des Transgens (das aus *Streptomyces*

viridochromogenes stammende Herbizid-Resistenzgen *pat41*) in *allen* transgenen (Tabak)-Linien nach Aufzucht der Pflanzen bei 37°C. Eine Aufklärung dieser Inaktivierung steht noch aus, die bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen gegen epigenetische Regulationsmechanismen. Auch ist nicht geklärt, ob die Temperatursensitivität des *pat41*-Gens möglicherweise auch im Spenderorganismus selbst vorliegt. Ob der fremde genetische Hintergrund tatsächlich verantwortlich ist, ist demnach noch offen. Da es sich hier um einen Umwelteffekt handelt, wird dieses Beispiel in Abschnitt 3.11.1 detaillierter beschrieben.

3.9.2 Genotypenabhängigkeit

Die Inaktivierung bzw. der Expressionsverlust von Transgenen wurde in einem breiten Spektrum verschiedenster Pflanzenarten gefunden (s. Reviews von Matzke *et al.* 1994, McElroy und Brettell 1994, Pawlowski und Somers 1996, Iyer *et al.* 2000). Der Nachweis der Beteiligung genetischer Faktoren (Dehio und Schell 1994) und die Selektion von Mutanten (Elmayan *et al.* 1998, Furner *et al.* 1998, Mittelsten-Scheid *et al.* 1998), in denen bestimmte Formen des *gene silencing* nicht realisiert werden, zeigen, dass diese Vorgänge unter genetischer Kontrolle stehen. Es ist daher zu erwarten, dass es diesbezüglich auch eine genetische Variabilität gibt, die sich in unterschiedlichen Genotypen und Spezies in verschiedenen Reaktionsmustern des *gene silencing* äußert. Darüber hinaus hat jede Pflanzenart spezifische Eigenschaften bezüglich der Genom-Organisation, die Einfluss auf den Typus der Transgen-Inaktivierung und die Frequenz, mit der solche Ereignisse stattfinden, besitzen können. Die Struktur pflanzlicher Genome sowie ihre Größe sind hoch variabel, ebenso der Anteil heterochromatischer oder repetitiver Bereiche.

Eine spezies-abhängige Instabilität vermuten Kumar und Fladung (2001) aufgrund der Ergebnisse einer Studie, in der die Stabilität des morphologischen Markers *ro/C* (s. Abschnitt 4.2) unter Kontrolle des 35S-Promotors über einen Zeitraum von 5-6 Jahren in transgenen Hybrid- und Wild-Linien der Gattung *Populus* ermittelt wurde. Insgesamt wurden 15 transgene Linien der Hybride *Populus tremula* x *P. tremuloides* und 7 transgene Linien der Wildart *Populus tremula* untersucht. Während nur 4 der 15 Hybridlinien Merkmalsverluste des Transgens zeigten, verhielten sich 6 der 7 Wildart-Linien instabil und revertierten zum Wildtyp. Auch Cherdshewasart *et al.* (1993) berichten über eine höhere Rate an instabilen Linien bei transgenen *Nicotiana plumbaginifolia*-Linien im Vergleich zu *Nicotiana tabacum* unter gleichen Bedingungen. In beiden Studien lässt sich allerdings nicht von signifikanten Unterschieden zwischen den verschiedenen Arten sprechen, da die Zahl der jeweils untersuchten Linien für eine statistische Absicherung zu niedrig war.

Dass auch geringe Unterschiede im genetischen Hintergrund Einfluss auf die Ausprägung von *gene silencing*-Effekten besitzen können, zeigen Untersuchungen zur *Antisense*-Suppression (s. Abschnitt 2.2) eines Enzyms aus der Stärkesynthese in Kartoffeln (GBSSI, *granule bound starch synthase* I, Wolters und Visser 2000). Mit Hilfe der *Antisense*-Strategie wurden gezielt

instabile Loci produziert, deren Eigenschaften in einigen Linien einen mehr oder weniger vollständigen Expressionsverlust sowohl des (*Antisense*-)Transgens als auch des homologen, pflanzeigenen Gens verursachen (ein Enzym lässt sich hierdurch „ausschalten“ und seine Funktion auf diese Weise ermitteln). Das *Antisense*-GBSSI-Gen wurde in 13 verschiedene Kartoffel-Sorten übertragen. Eine Evaluierung von insgesamt 1315 unabhängigen transgenen Linien ergab, dass sich der prozentuale Anteil an Linien, in denen eine Suppression des pflanzeigenen GBSSI-Gens zu beobachten ist, zwischen den einzelnen Sorten signifikant unterscheidet. Diese Ergebnisse erhärten die Vermutung, dass das Phänomen *gene silencing* einer genetischen Kontrolle unterliegt.

Die Ergebnisse einer Untersuchung von Mittelsten-Scheid *et al.* (1996) weisen darauf hin, dass auch verschiedene Ploidiegrade derartige Prozesse beeinflussen können: 10% der triploiden Nachkommen einer Kreuzung zwischen einer hygromycinresistenten (35S-hph), stabil exprimierenden, homozygoten *Arabidopsis* Linie mit einem tetraploidem Wildtyp zeigten einen Verlust der Hygromycinresistenz. Eine ähnliche „Stilllegung“ der Genexpression ist aus der klassischen Genetik bekannt. Eine Erhöhung des Ploidielevels in Mais kann sowohl zur Expressionssteigerung als auch zur Suppression bestimmter Gene führen (Guo *et al.* 1996). Auch die Beobachtung, dass polyploide Formen durch ein Abschalten „überschüssiger“ Gene „diploidisiert“ werden, ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen (Wilson *et al.* 1983, Soltis und Soltis 1993). Bei diesen Regulationsprozessen wird ebenfalls eine Beteiligung epigenetischer Faktoren vermutet (Comai 2000).

Der Einfluss der Ploidiestufe ist nicht nur vor dem Hintergrund möglicher Auskreuzungen von Transgenen und damit einhergehenden möglichen Änderungen des Expressionsverhaltens im neuen genetischen *Hintergrund* von Interesse. Es ist von vielen Arten bekannt, dass der Ploidiegrad einzelner Zellen eines Individuums in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand (De Rocher *et al.* 1990, Gilissen *et al.* 1993) und von exogenen Faktoren (Smulders *et al.* 1994) erheblich differiert. Auf den Einfluss solcher Ploidieunterschiede wird im folgenden Kapitel eingegangen, da es sich hier um einen entwicklungsspezifischen Einfluss handelt.

3.10 ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHE EINFLÜSSE AUF DIE STABILITÄT

Auch wenn die Entwicklung einer Pflanze das Ergebnis einer Interaktion zwischen endogenen **und** exogenen Faktoren darstellt, werden aus Gründen der Übersichtlichkeit entwicklungsspezifische Einflüsse und Umweltfaktoren (s. Kapitel 3.11) in getrennten Abschnitten behandelt. Waren Zusammenhänge zwischen beiden Faktoren Inhalt der Fragestellung einer Untersuchung, wird darauf hingewiesen.

Im vorigen Kapitel wurden mögliche Einflüsse des Ploidiegrades auf die Expressions-Stabilität von Transgenen in Verbindung mit dem genetischen Hintergrunds bereits diskutiert und auf die Tatsache hingewiesen, dass der Ploidiegrad einzelner Zellen einer Pflanze in Abhängigkeit vom

Entwicklungszustand (De Rocher *et al.* 1990, Gilissen *et al.* 1993) und von exogenen Faktoren (Smulders *et al.* 1994) erheblich differieren kann. Cytometrische Bestimmungen haben ergeben, dass bei einigen Arten der DNA-Gehalt einzelner Organe auf den 128fachen Wert des haploiden Genoms ansteigen kann (Damato 1985). Auch bei *Arabidopsis thaliana* ist dieser als *Polysomatie* bezeichnete Vorgang ausgeprägt (Galbraith *et al.* 1991, Arumuganathan und Earle 1991, Melaragno *et al.* 1993). Möglicherweise bestehen hier Verbindungen zu diversen Erscheinungen des epigenetischen *gene silencing*.

Dies unterstützen auch Ergebnisse einer Studie zur *Antisense*-Suppression des bereits in Abschnitt 3.9 erwähnten GBSSI-Enzyms in Kartoffelknollen (Kuipers *et al.* 1991). Kartoffelknollen weisen in Abhängigkeit von den äusseren Bedingungen einen unterschiedlichen Ploidiegrad auf. Bei Mikroknollen, deren Entwicklung unter *in vitro* Bedingungen induziert werden kann, findet man den für Saatkartoffeln üblichen tetraploiden Zustand (4C) während Kartoffelknollen aus dem Feldanbau Ploidiestufen von 8C bis 32 C aufweisen können (Hovenkamp-Hermelink *et al.* 1988). Darauf, dass im Verlauf dieser Aufregulierung mit der zunehmend höheren Kopienzahl des Transgens auch der Expressionslevel und dadurch auch der Suppressionseffekt ansteigt (siehe Abschnitt 3.4.4), weisen die Untersuchungen von Kuipers *et al.* (1991) hin, in denen unter Freilandbedingungen ein stärkeres *silencing* des endogenen GBSSI-Gens beobachtet wurde.

In diesem Fall war eine derartige Wirkung erwünscht. Beruht der veränderte Phänotyp einer transgenen Pflanze dagegen auf der enzymatischen Aktivität oder der Akkumulation eines fremden Proteins, äussern sich derartige Prozesse als Expressionsinstabilität.

Die *Antisense*-Suppression des GBSSI ist das einzige bisher publizierte Beispiel, in dem ein Zusammenhang zwischen *gene silencing* und der entwicklungsabhängigen Veränderung der Ploidiestufe hergestellt wird (s. Tabelle 4). Die Arbeit reiht sich andererseits ein in die das Thema „Entwicklungsspezifische Einflüsse“ dominierende Gruppe derjenigen Veröffentlichungen, in denen Untersuchungen zur Co- oder *Antisense*-Suppression pflanzeigener Gene oder Virus-Sequenzen beschrieben werden. Co- und *Antisense*-Suppression basieren auf posttranskriptionalen Prozessen der epigenetischen Genregulation (*PTGS*, s. Abbildung 1). Die in Tabelle 4 dokumentierten Untersuchungen enthalten in der Regel die entsprechenden Nachweise hierfür (*run-on transcription*). Transgene, die dieser Art von Einfluss unterliegen, bewirken prinzipiell ähnliche Phänomene:

1. Die Pflanzen zeigen in jungen Stadien der Entwicklung zunächst eine normale Expression bzw. keine Suppression,
2. Nach unterschiedlich langen Zeiträumen tritt ein Verlust oder eine Verringerung der Expression (bzw. Beginn der Suppression) ein, entweder gleichmäßig in allen Individuen (Elmayan und Vaucheret 1996, Balandin und Castresana 1997) oder stochastisch in einzelnen Individuen einer Nachkommenschaft und in einzelnen Zellen/Gewebebereichen der Pflanzen (Palauqui *et al.* 1996, Kunz *et al.* 1996).

3. Der Suppressions-Effekt stabilisiert sich und breitet sich u.U. systemisch aus.

4. Nach Abschluss der vegetativen und generativen Phase dieser Generation (bei den meisten der bisher beschriebenen Fällen handelt es sich um einjährige Pflanzen) findet eine Reversion während der frühen Samenentwicklung statt, der Verlauf beginnt von neuem.

In der Regel wurde der CaMV35S-Promotor zur Kontrolle der Gene verwendet - möglicherweise ist hierin der Grund zu sehen, warum der *silencing* Effekt in verschiedenen Pflanzenarten jeweils in vergleichbaren Entwicklungsphasen zu beobachten ist. In einigen Fällen ist allerdings auch eine lokale Suppression in bestimmten Geweben festgestellt worden (Gaffe *et al.* 1997, Smith *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990).

Einmal initiiert, kann der Suppressionseffekt sehr stabil sein und hält auch während einer künstlichen (bei einjährigen Pflanzen) Verlängerung der vegetativen Phase an. Dies zeigen Untersuchungen, in denen aus supprimierten Blättern *in vitro*-Pflanzen regeneriert wurden. Solche Pflanzen behalten den supprimierten Status bei und revertieren nicht in den aktiven Zustand. Erst nach einer Meiose bzw. während der frühen Embryogenese findet eine Reversion in den aktiven Zustand statt (Dehio und Schell 1994, Kunz *et al.* 1996, Balandin and Castresana 1997). Die Reversion ist, im Gegensatz zum *silencing*-Effekt, kein stochastisches Ereignis.

Der mit einer Co/Antisense-Suppression in Zusammenhang stehende Verlauf des posttranskriptionalen *gene silencing* während der Entwicklung der Pflanzen stimmt mit den z.Z. aktuellen Modellen der dem *gene silencing* zugrundeliegenden Mechanismen gut überein. Die Arbeit von Elmayan und Vaucheret (1996), in der ausschließlich Linien untersucht wurden, die nur eine einzelne Kopie enthielten, macht darüber hinaus deutlich, dass das posttranskriptionale *silencing* und der entwicklungsabhängige Verlauf dieses Phänomens nicht mit einem *homology dependent gene silencing* in Verbindung stehen muss.

Die Dominanz des posttranskriptionalen *silencing* in Verbindung mit entwicklungsspezifischen Einflüssen ist zwar auffällig, wahrscheinlich aber kein Anzeichen dafür, dass es andere Formen der Instabilität hier seltener gäbe. Der Grund hierfür liegt zum einen eher darin, dass die entwicklungsabhängige Expressionsinstabilität zuerst in Studien zur Co-Suppression gefunden wurde (de Carvalho *et al.* 1992) und solche neuen Erkenntnisse oft ein *follow up* von Untersuchungen mit ähnlichen Inhalten bewirken. Zum anderen ist eine dauerhafte Suppression häufig gerade das Ziel einer Co- oder Antisense-Strategie, etwa im Fall der Erzeugung einer Virus-Resistenz (Pang *et al.* 1996), in der durch Co-Suppression die Aktivität der viralen Gene stillgelegt werden soll. Es ist naheliegend, den Verlauf der Suppression während der Entwicklung der Pflanze in solchen Projekten zu analysieren, um festzustellen, ob ein dauerhafter Schutz vor dem Pathogen besteht. Dass auch andere Varianten des *gene silencing* mit entwicklungsspezifischen Einflüssen in Verbindung stehen können, zeigen die Untersuchungen von De Neve *et al.* (1999), in denen im Gegensatz zu den Co-Suppressionsarbeiten nach Linien gesucht wurde, die das *gene of interest* stabil exprimieren. Die Situation erscheint hier etwas komplexer, da jede der untersuchten Linien einen

Tabelle 4: Entwicklungsspezifische Einflüsse auf die Expressionsstabilität

Empfänger-spezies	Promotor	codierende Sequenz	Untersuchungsmaterial, Beobachtungen	Referenz
Expression heterologer Gene				
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S + double enhancer	GUS	- 11 Linien untersucht, hemi/homozygot, - alle Linien zeigen Suppression in unterschiedlichem Ausmaß - 2 Linien mit GUS-Aktivität in jungen Keimlingen, nach ca. 7 Tagen zunehmende Reduktion der Expression und vollst. Verlust, unabhängig vom Zygotiegrad - 9 Linien mit hoher GUS Aktivität in jungen Keim-lingen, langsame Reduktion der Expression im Verlauf von 4 Monaten in homozygoten, 12 Mona-ten in hemizygoten Individuen - Reversion in den aktiven Zustand während Meiose oder früher Samenentwicklung - PTGS nachgewiesen	Elmayan und Vaucheret 1996
<i>Arabidopsis thaliana</i>	35S	F-ab Antikörper-Produktion K+H- Ketten	- 5 Linien untersucht, homozygot, - alle Linien zeigen Verlust der Expression während der vegetativen Entwicklung, mit einem für jede Linie spezifischen Verlauf (Bestimmungen 21, 28, 40, 55, 68 Tage nach der Aussaat) - Reversion in den aktiven Zustand während Meiose oder früher Samenentwicklung - PTGS oder TGS nicht klar, in einigen Linien möglicherweise beide Formen gleichzeitig	De Neve et al. 1999
Co- und Antisense-Suppression				
<i>Solanum tuberosum</i>	35S	GBSSI (granule bound starch synthase I), <i>Antisense</i>	- eine Linie, homozygot, - Freilandversuche, Suppressionseffekt korreliert mit dem Anstieg des Ploidiegrades des Knollengewebes unter unterschiedlichen Bedingungen	Kuipers et al. 1991
<i>Nicotiana sylvestris</i>	35S	CHN48, Gen für Class I Chitinase	- eine Linie, homozygot, - Reduktion oder Verlust der Expression stochastisch 45 Tage nach Keimung und betrifft zwischen 1-100% der Nachkommen - nicht alle Teile der Pflanzen sind von der Suppression betroffen - <i>in vitro</i>-Regenerate behalten den supprimierten Status bei - Reversion in den aktiven Zustand während der frühen Samenentwicklung - PTGS nachgewiesen	Kunz et al. 1996

Tabelle 4: Entwicklungsspezifische Einflüsse auf die Expressionsstabilität-- Fortsetzung

Empfänger-spezies	Promotor	codierende Sequenz	Untersuchungsmaterial, Beobachtungen	Referenz
Co- und Antisense-Suppression				
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S + double enhancer Nia-Promotor Nii-Promotor	Nia (<i>N. tabacum</i> -Nitratreduktase) Nii (<i>N. tabacum</i> -Nitritreduktase) cDNAs	- 4 Linien, homozygot - Nia und Nii Suppression stochastisch während einer 2-wöchigen Phase zwischen Keimung und Blüte - der prozentuale Anteil betroffener Individuen ist für jede Linie charakteristisch - bei allen Linien treten normale, partiell sup-primierte und vollständig supprimierte Individuen auf - bei partiell supprimierten Individuen sind die supprimierten und nicht supprimierten Bereiche im Fall der Nia-Suppression durch eine vertikale, im Fall der Nii-Suppression durch eine horizontale Ebene voneinander getrennt - Reversion in den aktiven Zustand ?	Palauqui et al. 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	gn1, Gen für β -1,3-Glucanase	- eine Linie, homozygot, - Verlust der Expression wenige Wochen nach Keimung der Samen in allen Blättern der Pflanzen, stabil während vegetativer Phase und Blütenentwicklung - Reversion in den aktiven Zustand während Frucht reife und Samenentwicklung - keine Reversion in den aktiven Zustand in Pflanzen, die vegetativ aus supprimierten Blättern gewonnen wurden - PTGS nachgewiesen	Balandin und Castresana 1997
<i>Lycopersicon esculentum</i>	35S	pmeu1-AS Gen für Pectin methyl-ester-ase-Antisense	- eine Linie, homozygot, - Suppression der pmeu1-mRNA nur in reifenden Tomatenfrüchten, nicht in vegetativem Gewebe - Reversion in den aktiven Zustand während Meiose - PTGS nachgewiesen	Gaffe et al. 1997
Co-Suppressions-vermittelte Virus-Resistenz				
<i>Lactuca sativa</i>	35S	Nucleocapsid TSWV-BL	- eine Linie, hemi/homozygot - Suppression des Capsid-Gens in Abhängigkeit von Umweltbedingungen, Entwicklungsverlauf und Zygotiestatus - im homozygoten Zustand vollständige (Anzucht November) oder effizientere (mit spezifischem entwicklungsabhängigen Verlauf, Anzucht Januar) Suppression als in hemizygoten Individuen. - PTGS nachgewiesen - Reversion in den aktiven Zustand nach Meiose	Pang et al. 1996

spezifischen Verlauf der Transgen-Suppression aufwies. Die Autoren vermuten, dass hier transkriptionale *und* posttranskriptionale Mechanismen involviert sein können. Dass epigenetische Mechanismen an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind, ist für verschiedene Gene in Pflanzen gezeigt worden (Meyer 2000). Ein entsprechender Einfluss solcher Mechanismen auf die Expression eines Transgens, in Abhängigkeit von der Position im Genom und der Entwicklungsphase der Pflanze, ist deshalb zu erwarten.

Das Phänomen, dass *silencing*-Effekte im Verlauf der Entwicklung einer Pflanze variieren können, bereitet ebenso wie die im folgenden Abschnitt dokumentierten Beispiele für Umwelteinflüsse Schwierigkeiten bei der Beurteilung von Angaben zur Häufigkeit, mit der Expressionsinstabilitäten von Transgenen in Pflanzen auftreten können. Dieser Umstand wird in Abschnitt 3.12 ausführlicher diskutiert.

3.11 EINFLÜSSE DURCH UMWELTFAKTOREN

3.11.1 Abiotische Faktoren

Ziel des ersten in Deutschland durchgeführten Freisetzungsexperimentes war die Identifizierung eines „springenden Gens“ (Transposon) aus *Petunia hybrida*. Hierzu hatte die Arbeitsgruppe von Peter Meyer ein Gen für die Dihydroflavonol-4-Reductase (A1) aus *Zea mays* als „Falle“¹⁶ in eine weißblühende *Petunia*-Mutante übertragen. Infolge der Aktivität des Enzyms wird die Anthocyanvorstufe Dihydrokaempferol zu Leukopelargonidin reduziert, welches wiederum petunieneigene Enzyme in ein lachsrotes Pelargonidinpigment umwandeln können (Meyer *et al.* 1987). „Springt“ nun ein Transposon in das Transgen hinein und zerstört dabei seine Funktion, sollte die regenerierte Petunie nicht lachsrote, sondern wiederum weiße Blüten aufweisen. Aus Pflanzen, in denen ein solches (seltenes) Ereignis stattgefunden hat, lässt sich das Transposon mit Hilfe der angrenzenden, bekannten A1-Sequenzen isolieren.

Der Freisetzungsversuch nahm einen nicht erwarteten Verlauf (Meyer *et al.* 1992): Von 31000 lachsrot-blühenden Petunien zeigte nicht, wie erhofft, nur ein kleiner Bruchteil eine Reversion zum ursprünglich weißblühenden Phänotyp. Je nach Zeitpunkt der Evaluierung (Juni-August) verloren bis zu etwa 60% der Pflanzen die lachsrote Färbung mit unterschiedlicher Intensität, d.h. es entstanden schwach gefärbte, sektorierte und gefleckte Phänotypen. Vier Pflanzen bildeten über den gesamten Zeitraum reinweiße Blüten – die A1-Sequenzen dieser Pflanzen enthielt jedoch kein Transposon, sondern eine Deletion von 80 Basenpaaren. Ein Verlust der Blütenfarbe war in der gleichen Linie bereits zuvor unter Gewächshausbedingungen beobachtet worden, allerdings mit einer Frequenz von höchstens 5%. Eine detaillierte Analyse des transgenen Locus dieser Linie ergab, dass (i) eine Integration einer einzelnen Kopie des Transformationsvektors mit den Genkassetten 35S-A1/nos-*nptII* vorlag und (ii) Individuen mit

¹⁶ s. auch den Versuch von Renckens *et al.* 1992, Abschnitt 4.4

schwächer gefärbten Blüten einen erhöhten Methylierungsgrad im Bereich der übertragenen Sequenzen aufwiesen (Meyer und Heidmann 1994). Welcher Faktor letztendlich für die erhöhte Methylierung bzw. Inaktivierung der Transgene unter Freilandbedingungen verantwortlich war, wurde nicht endgültig geklärt. Da auch im Gewächshaus während der Aufzucht der Linie Temperaturen von bis zu 48°C geherrscht hatten, wird ein Einfluss durch höhere Lichtintensitäten im Freiland favorisiert (Meyer *et al.* 1992, Meyer und Heidmann 1994).

Die Untersuchungen von Meyer *et al.* gehören neben den Arbeiten zur Co-Suppression und zur Wechselwirkung zwischen transgenen Loci und damit einhergehenden *gene silencing*-Effekten (Matzke *et al.* 1989) zu den Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Transgen-Stabilität, weil hier, auch wenn dies zunächst unbeabsichtigt war, die Bedeutung von Freilandexperimenten und Umweltbedingungen deutlich wurde. Parallel zu den Untersuchungen von Meyer *et al.* stellten auch andere Gruppen einen Einfluss der Lichtverhältnisse auf die Expressionsstabilität fest (Arbeiten zur *Antisense*- und Co-Suppression der Chalconsynthase in Petunien, Mol *et al.* 1989, van der Krol *et al.* 1990). Entsprechend der Situation im Fall der Freiland-Petunien von Meyer *et al.* war eine stärkere Suppression des Chalconsynthase-Gens unter hohen Lichtintensitäten zu beobachten.

Die in Tabelle 5 dokumentierten Beispiele zeigen, dass neben der Lichtintensität (s.o., sowie Dorlhac de Borne *et al.* 1994 und De Carvalho *et al.* 1995) auch die Temperatur eine Rolle als beeinflussender Faktor spielt (Walter *et al.* 1992, Neumann *et al.* 1997, Köhne *et al.* 1998, Conner *et al.* 1998, Morino *et al.* 1999, Meza *et al.* 2001). Einen eher unerwarteten Einfluss auf die Stabilität der Expression besitzen aber auch einige zunächst trivial erscheinende Behandlungsmethoden, etwa die Art des Umtopfens (Brandle *et al.* 1995) oder die Keimungsbedingungen der Samen (*in vitro* vs. Gewächshaus, Hart *et al.* 1992, Palauqui und Vaucheret 1997). Die Ergebnisse der Untersuchungen von Conner *et al.* (1998), Morino *et al.* (1999) und Meza *et al.* (2001) weisen darüber hinaus auf die Bedeutung der Bedingungen hin, unter denen die Mutterpflanzen der getesteten Samen aufgewachsen sind. In allen drei Fällen wurde der Einfluss der Temperaturerhöhung während der Aufzucht untersucht. Einen deutlichen Zusammenhang fanden Conner *et al.* (1998) in transgenen Tabaklinien und Morino *et al.* (1999) in Reis. Die Daten von Meza *et al.* (2001) aus Versuchen an *Arabidopsis thaliana* hingegen zeigen, dass eine erhöhte Temperatur sowohl negativen als auch positiven Einfluss auf die Stabilität des untersuchten Merkmals (*nptII*) besitzen kann.

Die von Conner *et al.* (1998) untersuchten Linien enthielten nur 1-2 Kopien der T-DNA, d.h. diese Linien waren zuvor aus einer größeren Population transgener Pflanzen durch Analysen auf molekulargenetischer Ebene ausgelesen worden. Die Verlustraten des Transgens (*nptII*) in diesen Linien waren dementsprechend niedrig und lagen im Fall der ohne Temperaturstress aufgewachsenen Pflanzen im Frequenzbereich von genetischen Veränderungen, wie Mutationen und somatischen Rekombinationsereignissen (10^{-4} – 10^{-7} , s. Abschnitt 3.6). Ob genetische Veränderungen der Sequenz oder niedrigfrequente, epigenetische *gene silencing*-

Effekte Ursache des Merkmalsverlustes waren, wurde nicht untersucht. Die Frequenz von 3×10^{-2} in temperaturgestressten Pflanzen liegt hingegen über den aus der Literatur bekannten Daten für genetische Veränderungen, obwohl Umweltfaktoren durchaus einen Einfluss auf die Rate derartiger Ereignisse besitzen können (Puchta *et al.* 1995b, Ries *et al.* 2000, Kovalchuk *et al.* 2000). Möglicherweise sind in diesem Fall sowohl genetisch als auch epigenetisch bedingte Instabilitäten beteiligt. Conner *et al.* (1998) vermuten einen Einfluss durch Temperatur- und/oder Trockenstress während der Embryonalentwicklung der Nachkommen.

Einige der in Tabelle 5 dokumentierten Arbeiten beschreiben Effekte, die weder die üblichen Merkmale eines epigenetischen *gene silencing* aufweisen, noch mit Deletionen oder Mutationen der entsprechenden Sequenzen in Verbindung gebracht werden konnten (Walter *et al.* 1992, Neumann *et al.* 1997, Köhne *et al.* 1998). Eine Aufklärung dieser Vorgänge, die im folgenden näher beschrieben werden steht noch aus (Inge Broer, pers. Mitteilung):

(i) Neumann *et al.* (1997) berichten über die Temperatursensitivität von Genkassetten, die das *nptII*-Gen unter Kontrolle des *nos*-Promotors und das Luziferase-Reportergen (*luc*) unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors oder eines *rbcS*-Promotors aus Sojabohnen enthielten. Nach Übertragung dieser Konstrukte in Tabak fanden Neumann *et al.*, dass ca. 40% der Linien nach einer Wärmebehandlung von 37°C über 2-3 Stunden sowohl die *nptII*- als auch die Luziferaseaktivität einstellten. Die Inaktivierung war reversibel, nach zwei Stunden anschließender Kultivierung bei 25°C war die volle Aktivität wiederhergestellt. Die Eigenschaft „hitzeempfindlich“ war vererbbar, bei einigen Linien auch entwicklungsabhängig. Veränderungen des Methylierungsmusters wurden nicht gefunden und der mRNA-Level beider Gene stieg während der Wärmebehandlung an; damit lässt sich dieses Phänomen in keines der z.Z. diskutierten *gene silencing*-Modelle einordnen. Obwohl die in dieser Untersuchung verwendeten Genkassetten in vielen Arbeitsgruppen benutzt werden, sind bislang keine ähnlichen Fälle dieser Art beschrieben worden (das Ergebnis wurde allerdings in anderen Arbeitsgruppen reproduziert, pers. Mitteilung Inge Broer).

(ii) In einer Arbeit von Köhne *et al.* (1998) wird ein Verlust der Expression des *Phosphinothricin-Acetyltransferasegens* (*pat41*) aus *Streptomyces viridochromogenes* in transgenen Tabaklinien nach Kultivierung unter moderat erhöhter Temperatur beschrieben. Die Expression des *pat*-Gens erzeugt, wie auch das bereits erwähnte *bar*-Gen, in transgenen Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Herbizid *Glufosinat-Ammonium* (Basta). In sämtlichen Tabaklinien, die das *pat41*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, war nach 10tägiger Kultivierung bei 37°C eine starke Reduktion der Herbizidresistenz sowie des *pat41*-mRNA Levels zu beobachten. Der Verlust der Expression war auch hier reversibel - nach 2 Tagen Kultivierung bei 24°C hatte die *pat*-Aktivität in allen Pflanzen den ursprünglichen Wert wieder erreicht. Ein synthetisches *pat*-Gen (*patS*), das bezüglich des *codon usage* für die Expression in Pflanzen optimiert worden war, zeigte dagegen dieses Verhalten nicht. Methylierungen im transgenen Locus wärmebehandelter *pat41* - Pflanzen wurden nicht gefunden. Durch die *codon-usage*

Tabelle 5: Einfluss abiotischer Faktoren

Empfänger- spezies	Promotor	codierendeSequenz	Auslöser, Umweltfaktor	Anmerkungen/ Interpretationen	Referenz
<i>Petunia hybrida</i>	35S	<i>chs-AS</i> , Chalcon-synthase aus <i>P. hybrida</i> in <i>Antisense</i> -Orientierung	Lichtintensität unter Gewächshaus-bedingungen	-Unterschiedlich intensiver Verlust des Blütenfarbstoffs durch <i>Antisense</i> -Suppression -eine von 2 bei hoher Lichtintensität getestete Linien mit geflecktem Phänotyp produzieren unter diesen Bedingungen nur weiße Blüten -Wiederherstellung der Aktivität nach Reduktion der Lichtintensität -Interpretation: Positionseffekt in der betreffenden Linie,	Mol et al. 1989
<i>Petunia hybrida</i>	35S	<i>chs-S</i> , Chalcon-synthase aus <i>P. hybrida</i> in <i>Sense</i> -Orient.	Lichtintensität unter Gewächshaus-bedingungen	-Unterschiedlich intensiver Verlust des Blütenfarbstoffs durch Co-Suppression -2 von 2 bei hoher Lichtintensität getesteten Linien mit geflecktem Phänotyp produzieren unter diesen Bedingungen nur weiße Blüten	van der Krol et al. 1990
<i>Petunia hybrida</i>	35S	A1 – Dihydroflavonolreduktase aus <i>Zea mays</i>	Temperatur (?) und Lichtintensität unter Freilandbedingungen	-95% der Individuen der A1-Transformante RL01-17-3 produzieren Pelargonidin in ihren Blüten (lachsrosa) unter Gewächshausbedingungen -31000 hemizygote Nachkommen dieser Linie unter Freilandbedingungen getestet -Unterschiedlich intensiver Verlust des Blütenfarbstoffs in Abhängigkeit von Jahreszeit (Juni vs. August 1990) und Alter der Pflanzen -erhöhte Methylierung im Bereich des 35S-Promotors	Meyer et al. 1992
<i>Medicago sativa</i>	35S	<i>pat41</i> , Phosphinothricin-Acetyltransferase aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Temperatur (Phosphinothricin-resistente Zellkulturen, unter Standardbedingungen bei 24°C, für 10 Tage bei 37°C)	-eine Zelllinie untersucht -95% der Zellen verloren die Phosphinothricin-Resistenz nach Wärmebehandlung -keine Deletion oder Mutation des Gens	Walter et al. 1992
<i>Nicotiana sylvestris</i>	35S	<i>chn48</i> , Chitinase aus <i>N. tabacum</i>	Behandlung der Keimlinge während der Aufzucht: <i>in vitro</i> vs. Gewächshaus	-(nicht geplante) Reduktion des endogenen und transgenen PR-Proteins durch Co-Suppression -Suppressionseffekt in Pflanzen, die unter <i>in vitro</i> -Bedingungen angezogen und anschließend ins Gewächshaus überführt wurden -kein Suppressionseffekt in Pflanzen, die direkt aus Samen im Gewächshaus angezogen wurden	Hart et al. 1992

Tabelle 5: Einfluss abiotischer Faktoren - Fortsetzung

Empfänger- spezies	Promotor	codierendeSequenz	Auslöser, Umweltfaktor	Anmerkungen/ Interpretationen	Referenz
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>Nia</i> , Nitratreduktase aus <i>N. tabacum</i>	Behandlung der Keimlinge während der Aufzucht: Lichtintensität	-Untersuchung zur Deregulation der N-Assimilation -Co-Suppression aufgrund der Existenz des entsprechenden <i>nia</i> -Gens im Tabak Genom -Verzögerung des Suppressions-Effekts nach Aufzucht bei niedriger Lichtintensität	Dorlhac de Borne et al. 1994
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>csr1</i> , mutierte und dadurch Chlorsulfuron-insensitive Acetohydroxysäure-Synthase aus <i>A. thaliana</i>	Behandlung der Keimlinge während der Aufzucht: Umtopfpraxis	-Erzeugung Herbizid- (Chlorsulfuron-)resistenter Linien durch Expression des <i>csr1</i> -Gens -stabile Expression und Resistenz im Gewächshaus -unter Freilandbedingungen Verlust der Expression bei 59% der homozygoten Nachkommen - <i>silencing</i> durch Co-Suppression aufgrund der Existenz eines homologen Gens in Tabak - <i>silencing</i> nach Umtopfen der Keimlinge zur Anzucht im Gewächshaus -kein <i>silencing</i> bei Keimung und Aufzucht direkt im Feld -Wiederherstellung der Aktivität nach Meiose	Brandle et al. 1995
<i>Lactuca sativa</i>	35S	Nucleocapsid-Gen aus TSWV-BL	Jahreszeit der (Gewächshaus-) Aufzucht November vs. Januar	-Erzeugung von Virusresistenz durch Co-Suppression -eine Linie, homozygot -Vollständige Suppression des Capsid-Gens bei „November-Pflanzen“ während der gesamten Lebensdauer, bei „Januar-Pflanzen“ vollständige Suppression erst nach ca. 6 Wochen -Wiederherstellung der Aktivität nach Meiose	Pang et al. 1995
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>gn1</i> - beta-1,3-glucanase	Lichtintensität unter kontrollierten Bedingungen	-eine homozygote Linie untersucht -vollständiger Verlust der Expression nach 6 Wochen bei 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, nach 4 Wochen bei 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$	De Carvalho et al. 1995
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>nia</i> , Nitratreduktase aus <i>N. tabacum</i>	Anzucht der Keimlinge unter <i>in vitro</i> Bedingungen	-Co-Suppression aufgrund der Existenz des entsprechenden <i>nia</i> -Gens im Tabak Genom -Erhöhung der Suppression bei Aufzucht der Pflanzen unter <i>in vitro</i> Bedingungen, 13 unabhängigen Linien untersucht	alauqui und Vaucheret 1995

Tabelle 5: Einfluss abiotischer Faktoren - Fortsetzung

Empfänger- spezies	Promotor	codierende Sequenz	Auslöser, Umweltfaktor	Anmerkungen/ Interpretationen	Referenz
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S rbcS	<i>luc</i> <i>npfl</i>	Temperatur - Wärmebehandlung bei 37°C über 2-3 Stunden	-10 Linien untersucht, 4 mit Suppression beider Gene während der Wärmebehandlung -mRNA beider Gene vorhanden -keine Methylierungen -Eigenschaft <i>hitzeempfindlich</i> vererbbar -reversibel, nach 2 Stunden Kultivierung bei 25°C volle Expression wiederhergestellt -Ursache bisher nicht geklärt	Neumann <i>et al.</i> 1997
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>pat41</i> vs. <i>patS</i>	Temperatur - Kultivierung im Ge- wächshaus bei 37°C	- 27 <i>pat41</i> -Linien untersucht -nach 10tägiger Kultur bei 37°C Verlust der Herbizid-Resistenz in allen Linien -mRNA und Protein nicht nachweisbar -Reversion nach 2 Tagen Kultivierung bei 24°C -synthetische Variante <i>patS</i> (geringerer GC-Gehalt) nicht wärmesensitiv -Ursache der <i>pat41</i> -Instabilität bisher nicht geklärt	Köhne <i>et al.</i> 1998
<i>Nicotiana tabacum</i>	nos	<i>npfl</i>	Einfluss von Temperatur und Trockenheit während der (Gewächshaus-) Aufzucht der Mutter- pflanzen	-18 homozygote Linien mit 1-2 Transgen-Kopien untersucht, insgesamt 820000 Keimlinge auf Kanamycin getestet -Ausfall der Resistenz bei $0,5-5,9 \times 10^{-4}$ -Ausfall bei hoher Temperatur und Trockenstress während der Aufzucht der Mutterpflanzen bei $2,9 \times 10^{-2}$ - Einfluss während der Embryonalentwicklung wird vermutet	Conner <i>et al.</i> 1998
<i>Oryza sativa</i>	lpt2 (Lipidtransfer Protein2- Promotor aus Gerste)	GUS	Einfluss der Temperatur (oder Sommer vs. Winter?) während der Aufzucht der Mutterpflanzen	-eine Linie untersucht, aleuronzell-spezifische GUS- Expression im Samen -Aufzucht der Mutterpflanzen im Sommer bei 25-33°C bewirkt stärkere Suppression in der Aleuronzellen der Samen als Aufzucht im Winter bei 19-25°C	Morino <i>et al.</i> 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	35S	<i>npfl</i>	Einfluss von Stress (Temperatur, Insektizid- Behandlung) während der Aufzucht der Mutterpflanzen im Gewächshaus	-20 hemi- und homozygote Linien untersucht, Keimungstest der Samen auf Kanamycin -sowohl Erhöhung als auch Verringerung des <i>silencing</i> -Effekts in Nachkommen von „temperatur-gestressten“ Mutterpflanzen - kein Effekt durch Insektizidbehandlung	Meza <i>et al.</i> 2001

Anpassung besitzt das *patS* einen niedrigeren GC-Gehalt als *pat41*. Ob hierdurch auch eine Anpassung an den GC-Gehalt des genetischen Hintergrundes von *Nicotiana tabacum* erfolgte, ist nicht ausgeschlossen (s. hierzu auch Abschnitt 3.9). Eine Erklärung für die Temperatursensitivität des *pat41*-Gens steht noch aus.

Trotz der seit mehreren Jahren existierenden Hinweise auf verschiedene Einflüsse abiotischer Faktoren auf die Gen-Stabilität wurde erst in letzter Zeit damit begonnen, zielgerichtete und systematische Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchzuführen. In einigen der früheren Studien ist der „zufällige“ Charakter der präsentierten Ergebnisse offensichtlich. Andererseits zeigen gerade die Ergebnisse der Untersuchung von Meza *et al.* (2001), wie weit man von einem Verständnis der Wirkungsweise von Umweltfaktoren bei der Beeinflussung der Stabilität von (Trans)genen entfernt ist.

Transgene Gehölzpflanzen wurden bislang nicht in derartige Studien einbezogen. Aufgrund der langen Generationsdauer sind Gehölze generell für experimentelle Studien zur (Trans)Gen-Stabilität wenig geeignet – dementsprechend wenige Publikationen befassen sich mit dieser Fragestellung. Andererseits sind gerade Gehölzpflanzen mehr als 1-2-jährige krautige Pflanzenarten über z.T. extrem große Zeiträume, in denen sich sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen anreichern können, verschiedensten Umweltbedingungen ausgesetzt. In diesem Bereich besteht erheblicher Forschungsbedarf.

3.11.2 Biotische Faktoren

Die im vorigen Kapitel dokumentierten Auswirkungen abiotischer Umweltfaktoren, z.B. Stress und Temperaturerhöhung, lassen Einflüsse von Seiten biotischer Faktoren auf die Expressionsstabilität gleichfalls erwarten. Auf Insektenfraß und Pathogenbefall reagiert die Pflanze mit der Expression einer Reihe spezifischer PR- (pathogenesis-related) und wundinduzierbarer Gene. Über Interaktionen zwischen Transgen-Instabilitäten und Insektenbefall oder Pilzinfektionen existieren bislang keine Berichte, wohl aber über die Inaktivierung von Transgenen durch Virusinfektionen (Al-Kaff *et al.* 2000). Diese Form der Instabilität steht in Zusammenhang mit der engen Beziehung zwischen dem *gene silencing* und der pflanzlichen Virusabwehr. Das *silencing* viraler Gene gehört zum natürlichen Repertoire der pflanzlichen Pathogenabwehr, und die zugrundeliegenden Mechanismen werden im Zuge der Untersuchungen zum transgenen *gene silencing* zunehmend klarer (Covey und Al-Kaff 2000, Marathe *et al.* 2000a/b).

Dass virale Sequenzen und homologe, endogene Kopien im Genom der Pflanze miteinander agieren und sich unter Umständen gegenseitig „stilllegen“ können, ist mehrfach experimentell nachgewiesen worden, ein Vorgang, der als *virus induced gene silencing* (VIGS) bezeichnet wird (Kumagai *et al.* 1995, English *et al.* 1996, Kjemtrup *et al.* 1998, Ruiz *et al.* 1998, Atkinson *et al.* 1998, Jones *et al.* 1999). Im Prinzip lässt sich jedes beliebige Gen durch eine Infektion mit

einem rekombinanten Virus, dessen Genom die entsprechende Sequenz enthält, mehr oder weniger effizient „abschalten“. Die Pflanzen entwickeln dabei gleichzeitig eine Resistenz gegenüber dem Virus, wenn es sich bei den Sequenzen um in das Pflanzengenom integrierte Transgene handelt, nicht jedoch unbedingt beim *silencing* pflanzeigener Sequenzen (Ruiz *et al.* 1998, Jones *et al.* 1999).

Diese Arbeiten sind Beispiele für VIGS auf experimenteller Ebene, in denen Homologien zwischen codierenden Sequenzbereichen als auslösende Faktoren fungierten. Al-Kaff *et al.* (2000) schildern dagegen eine Variante des VIGS, die transgene Linien aus der Familie der Kreuzblütler im Feldanbau betreffen kann (bisher wurden Untersuchungen nur unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt) und in der eine Promotor-Homologie Ursache des *gene silencing* einer endogenen (transgenen) Sequenz darstellt. In diesen Studien wurden transgene Rapslinien, die Genkassetten zur Expression des Reportergens GUS und des Herbizid-Resistenzgens *bar* enthielten, mit verschiedenen, natürlichen CaMV-Stämmen infiziert. Übereinstimmend zeigten alle Linien, die den CaMV35S-Promotor und/oder –Terminator zur Kontrolle der o.g. Gene enthielten, ein je nach CaMV-Stamm mehr oder weniger starkes *silencing* der Transgene. Die *bar*-Gen-Transformanten verloren durch die Virusinfektion ihre zuvor stabil vorhandene Herbizidresistenz. Es ließ sich nachweisen, dass die Suppression der Transgen-Expression bei Vorliegen einer Terminator-Homologie auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet, im Falle der Promotor-Homologie dagegen auf transkriptioneller Ebene (vergleiche Abschnitt 3.4.3).

Der 35S-Promotor ist in vielen transgenen Rapslinien zu finden. Unter diesem Aspekt sind die Ergebnisse der Studien von Al-Kaff *et al.* durchaus relevant, auch wenn diese Problematik nur eine bestimmte Gruppe von Pflanzen betrifft. Die Nachteile, die durch die Verwendung viraler Komponenten zur Regulation von Transgenen entstehen können, werden hier offensichtlich. Der Einsatz solcher Komponenten stellt allerdings keine Notwendigkeit dar. Für eine Anwendung, die bei der Konstruktion der Transformationsvektoren auf virale Sequenzen verzichtet, besteht demnach bezüglich dieser Problematik nicht unbedingt Forschungsbedarf.

Virusinfektionen können jedoch auch auf andere und weniger spezifische Weise den Expressionsverlust eines Transgens hervorrufen bzw. genauer formuliert, die Wirkung der Transgen-Expression aufheben. Diese Form der Instabilität betrifft Linien, in denen die Co-Suppression bestimmter Gene gezielt als Merkmal erwünscht ist, z.B. bei der Erzeugung virusresistenter Sorten oder im Fall des „Ausschaltens“ bestimmter Enzyme, um Stoffwechselwege oder die Akkumulation von Metaboliten zu modifizieren. Genkassetten und Konstrukte, deren Struktur die Wahrscheinlichkeit eines starken Co-Suppressionseffektes (bzw. eines wirksamen posttranskriptionalen *gene silencing*) erhöhen, wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (Abschnitt 3.4.3).

Wenn das posttranskriptionale *gene silencing* bzw. PTGS, wie oben bereits erwähnt, zum natürlichen Repertoire der pflanzlichen Virusabwehr gehört, ist zu erwarten, dass Viren

Gegenstrategien entwickelt haben. Mehrere Studien haben inzwischen die Existenz solcher Strategien belegt. Aus älteren Untersuchungen zur pflanzlichen Virusabwehr war bereits bekannt, dass die Expression einer speziellen Sequenz des Potyvirus TEV (Tobacco etch virus) mit der Bezeichnung P1/HC-Pro (helper component-proteinase) in Tabakpflanzen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit sonst eher harmloseren Virenstämmen auslöst (Vance *et al.* 1995, Pruss *et al.* 1997). Nach Kreuzung von Tabaklinien, die die P1/HC-Pro Sequenz exprimieren, mit transgenen Linien, die ein co-supprimiertes GUS-Reportergen enthalten, war eine Wiederherstellung der GUS-Expression in der Nachkommenschaft zu beobachten (Anandalakshmi *et al.* 1998, Kasschau und Carrington 1998). In gleicher Weise ließ sich ein posttranskriptionales *virus induced gene silencing* durch die Expression der P1/HC-Pro-Sequenz „abschalten“ (Anandalakshmi *et al.* 1998) oder co-supprimierte, endogene Sequenzen wieder aktivieren (Marathe *et al.* 2000b). Neben P1/HC-Pro wurden inzwischen fünf weitere PTGS-Suppressor Faktoren in verschiedenen Viren identifiziert (Beclin *et al.* 1998, Brigneti *et al.* 1998, Voinnet *et al.* 1999), d.h. derartige Mechanismen sind durchaus verbreitet. Die Funktionsweise der Suppressoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt, die gegenwärtig vorliegenden Daten weisen jedoch daraufhin, dass die Suppression des posttranskriptionalen *gene silencing* in unterschiedlicher Art und Weise erfolgt (Marathe *et al.* 2000b). Nach Llave *et al.* (2000) und Mallory *et al.* (2001)

Im Gegensatz zu dem anfangs beschriebenen Beispiel der Inaktivierung von 35S-Promotor-kontrollierten Genen lässt sich eine durch Viren verursachte PTGS-Suppression nicht auf bestimmte Fälle eingrenzen, sondern betrifft alle Linien, in denen die Suppression endogener oder viraler Gene Ziel der genetischen Modifikation ist. Im Prinzip birgt jeder Virusbefall solcher Pflanzen das Risiko einer Wiederaufnahme der Expression der Zielsequenzen. Die Wiederherstellung der Aktivität ließe sich durch eine parallele Übertragung von viralen Sequenzen, die eine Resistenz gegenüber den PTGS-supprimierenden Virus-Stämmen vermitteln, vermeiden. Die Durchführung einer derartigen Strategie wird allerdings durch den Umstand erschwert, dass bisher wahrscheinlich nur ein Bruchteil solcher Suppressionsfaktoren bzw. Virus-Stämme, die die entsprechenden Sequenzen besitzen, bekannt sind. Auf diesem Gebiet besteht deshalb ein erheblicher Forschungsbedarf.

3.12 ANGABEN ZUR HÄUFIGKEIT DES VERLUSTES TRANSGENER MERKMALE

Es ist in Abschnitt 3.3 darauf hingewiesen worden, dass die Begriffe *gene silencing*, Transgen-Instabilität oder Merkmalsverlust unterschiedliche Vorgänge und Phänomene beschreiben. Je nach Inhalt und Zielsetzung einer Untersuchung werden diese Begriffe unterschiedlich interpretiert und definiert. Darüber hinaus wurde in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, dass die Stabilität eines Transgens durch verschiedene endogene und exogene Faktoren auf noch unbekannte Art und Weise beeinflusst werden kann. Die Angaben zur Frequenz besitzen

deshalb in der Regel nur vor dem wissenschaftlichen und experimentellen Hintergrund der betreffenden Studie und nur für die in dieser Studie erzeugten Linien eine Bedeutung. Aus Untersuchungen, in denen *interne* Vergleiche zwischen verschiedenen Bedingungen, Arten, Transformationsmethoden, Sequenzen u.a. vorgenommen werden, lassen sich unter Umständen aus den ermittelten Frequenzen Schlussfolgerungen bezüglich der Einflüsse der untersuchten Parameter auf den Stabilitätsgrad der Transgen-Expression ziehen – aber auch hier sind Angaben zur Häufigkeit nicht als allgemeingültige Aussagen zu verwenden. In diesem Abschnitt soll anhand von Beispielen deutlich gemacht werden, warum Angaben zur Frequenz von Transgen-Instabilitäten vorsichtig beurteilt werden müssen und auf die Kriterien hingewiesen werden, die hierbei zu beachten sind.

Die Arbeiten von Conner *et al.* (1998) und Elmayan und Vaucheret (1996) beschreiben Versuche, in denen die Stabilität des Reportergens GUS (Elmayan und Vaucheret) bzw. des Kanamycinresistenzgens *nptII* (Conner *et al.*) in (homozygot-) transgenen Tabaklinien über mehrere Generationen untersucht wurde. Analysiert wurden jeweils 12 (Elmayan und Vaucheret) bzw. 18 (Conner *et al.*) Transformanten, die 1 oder 2 Kopien der übertragenen Gene besaßen, da diese erfahrungsgemäß eine größere Expressionsstabilität aufweisen als Linien mit höherer Kopienzahl.

Elmayan und Vaucheret führten *quantitative* Bestimmungen der GUS-Expression in verschiedenen Stadien der Pflanzenentwicklung durch und fanden in *sämtlichen* Nachkommen *aller* 12 Linien *gene silencing*-Effekte. Untersucht wurden pro Linie jeweils 5 Individuen. Zwei Linien, deren Samen während und kurz nach der Keimung die höchste GUS-Aktivität besaßen, zeigten bereits ab der zweiten Woche der Aufzucht eine fast völlige Inaktivierung der GUS-Expression. Eine Wiederherstellung der Gus-Aktivität fand erst im Keimlingsstadium der folgenden Generation statt. Die restlichen Linien wiesen einen jeweils unterschiedlichen Verlauf der GUS-Expression auf, ohne die GUS-Aktivität dabei vollständig zu verlieren. Der spezifische Verlauf der Expression in jeder Linie war in mehreren aufeinanderfolgenden Generationen in gleicher Weise zu beobachten.

Conner *et al.* ermittelten die Stabilität ihrer Linien über Keimungstests der Samen auf kanamycinhaltigem Medium (insgesamt fast 1 Mio. Samen aus 18 Linien). Sie berichten über einen stochastisch auftretenden Ausfall des *nptII*-Gens in einer Größenordnung von $0.5\text{--}5.9 \times 10^{-4}$ (die Frequenz stieg auf 2.9×10^{-2} wenn die Mutterpflanzen unter Stress aufwuchsen, s. Abschnitt 3.11.1). Die einzelnen Linien verhielten sich bezüglich der Ausfallsrate relativ einheitlich.

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Studien besteht zunächst in der Wahl des untersuchten Transgens. Eine Reduktion der GUS-Expression ist mittels eines quantitativen Assays detektierbar, wohingegen eine Reduktion der *nptII* Expression selbst auf 10% des ursprünglichen Levels noch eine Kanamycinresistenz vermitteln kann. Conner *et al.* hätten

deshalb einen quantitativen *silencing* Effekt wie Elmayan und Vaucheret in den GUS-Linien nicht feststellen können. Änderungen der Expression während der Entwicklung der Pflanzen wurden als Fragestellung in der Untersuchung von Conner *et al.* ohnehin nicht berücksichtigt. Die Einschränkung auf ein einziges Stadium hätte überdies zur Folge gehabt, dass die beiden im Anschluss an die Keimungsphase supprimierten Linien von Elmayan und Vaucheret in der Studie von Conner gar nicht als instabil erfasst worden wären. Conner *et al.* dagegen finden stochastisch auftretende Ausfälle, die Elmayan und Vaucheret wiederum aufgrund der geringen Stichprobe von 5 Individuen nicht hätten feststellen können. Diese Beispiele zeigen u.a. auch, dass Instabilitäten in Abhängigkeit vom experimentellen Design unter Umständen gar nicht als solche erkannt werden.

Die von Conner *et al.* (1998) untersuchten Linien mit 1-2 Kopien der T-DNA waren zuvor aus einer größeren Population transgener Pflanzen durch Analysen auf molekulargenetischer Ebene ausgelesen worden. Dies erklärt die in allen Linien relativ einheitliche, niedrige Verlustrate der Transgen-Expression von $0,5-5,9 \times 10^{-4}$, die sich bereits im Bereich von genetischen Veränderungen wie Mutationen und somatischen Rekombinationsereignissen befindet. Ob genetische Veränderungen der Sequenz oder niedrigfrequente, epigenetische *gene silencing*-Effekte Ursache des Merkmalsverlustes waren, wurde bei Conner *et al.* nicht untersucht. In ihrem Petunienexperiment (s. Abschnitt 3.11.1) wiesen Meyer *et al.* (1992) z.B. nach, dass die unter 31000 Pflanzen befindlichen vier reinweiß-blühenden Individuen eine Deletion von 80 Basenpaaren im A1-Gen besaßen. Da alle vier Pflanzen aus einer Samenkapsel stammten (daher das einheitliche Mutationsereignis), wurde eine Verlustrate von 7×10^{-5} angegeben. Dieser Merkmalsverlust, der in diesem Fall eindeutig auf eine genetische Veränderung zurückgeführt werden konnte, liegt damit im Bereich der von Conner *et al.* beschriebenen Frequenzen (zu den durch epigenetisches *gene silencing* verursachten, hohen Merkmalsverlusten im Petunienexperiment von Meyer *et al.* s. Abschnitt 3.11.1).

Merkmalsinstabilitäten in einer anderen Größenordnung beschreiben Meza *et al.* (2001). Wie bei Conner *et al.* wurde auch hier die Stabilität des *nptII*-Gens in mit Hilfe des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers hergestellten transgenen Linien durch Keimungstests der Samen auf kanamycinhaltigem Medium ermittelt. Anders als Conner *et al.* führten Meza *et al.* keine Vorselektion durch, d.h. sämtliche Linien des Transformationsexperimentes wurden in dieser Studie erfasst und analysiert. Von insgesamt 111 transgenen *A. thaliana* Linien, die mit zwei unterschiedlichen *nptII*/GUS Konstrukten transformiert worden waren, zeigten 56% Merkmalsinstabilitäten des *nptII*-Gens. Die Verlustrate des Merkmals „Kanamycinresistenz“ lag in diesen Linien zwischen 1-100%. Diese Daten widersprechen allerdings nicht den oben beschriebenen Angaben von Conner *et al.* Der Unterschied zwischen beiden Studien besteht lediglich in der Auswahl der Linien, die näher charakterisiert wurden: Meza *et al.* analysieren und beschreiben vornehmlich die instabilen Linien, während Conner *et al.* diese vorher ausselektieren und nur die stabile(re)n Linien berücksichtigen.

Die bisher beschriebenen Merkmalsinstabilitäten bezogen sich auf Nachkommen von Pflanzenarten, die über Samen vermehrt werden, d.h. in diesen Fällen spricht man von meiotischen Instabilitäten. Über mitotische Instabilitäten in vegetativ vermehrten Pflanzenarten liegen weitaus weniger Informationen vor. Die wenigen hierzu erschienenen Publikationen berichten generell über eine geringe Frequenz des Merkmalsverlustes, z.B. in Kartoffeln (Ottaviani *et al.* 1992, Fladung 1996). Eine andere Situation liegt vor, wenn eine vegetative Vermehrung künstlich über *in vitro* Systeme unter Verwendung von Kalluskulturen vorgenommen wird, hier sind Merkmalsverluste weitaus häufiger zu beobachten (s. Abschnitt 3.5).

Daten zur Frequenz der Transgen-Instabilität sind, isoliert betrachtet, generell wenig aussagekräftig. Auf eine vergleichende, tabellarische Zusammenstellung solcher Daten wurde hier verzichtet, da die Menge an Parametern, Eigenschaften und Besonderheiten der jeweiligen Untersuchungen, deren Berücksichtigung für eine Beurteilung unerlässlich ist, in Tabellenform nicht darzustellen ist. Anhand der oben beschriebenen Beispielen sollte deutlich gemacht werden, dass bei der Bewertung von Daten zur Frequenz z.B. berücksichtigt werden muss,

- ob sich die Angaben auf die Rate instabiler Linien eines Transformationsexperimentes oder auf die Frequenz des Merkmalsverlust in einer bestimmten transgenen Linie unter definierten Bedingungen beziehen,
- welches Versuchsstadium betrachtet wurde (wurden z.B. Primärtransformanten oder bereits vorselektierte Linien untersucht),
- welche Eigenschaften untersucht wurden (handelt es sich um quantitative oder um qualitative Merkmale),
- welche bzw. wieviele Entwicklungsstadien der Pflanzen geprüft wurden (entwicklungsabhängige Merkmalsänderungen werden nur im Fall einer Analyse der entsprechenden Stadien registriert).

Unklarheiten entstehen u.a. auch dadurch, dass die Begriffe *gene silencing* oder Instabilität in der Literatur unterschiedlich definiert werden. Während Mittelsten-Scheid und Paszkowski (2000) die Eingrenzung vornehmen „*gene silencing leads to loss of **previously** active loci*“, benutzen andere Autoren den Begriff *gene silencing* auch für eine von Beginn an bestehende schwache Expression (z.B. Cervera *et al.* 2000) oder ein *gene silencing* wird bereits dann „diagnostiziert“, wenn eine Expression möglicherweise nie stattgefunden hat (z.B. Curtis *et al.* 2000). Es ist deshalb nicht überraschend, dass Angaben über die Frequenz von *gene silencing*-Ereignissen stark divergieren.

4 TRANSGENE GEHÖLZPFLANZEN

4.1 MERKMALSSTABILITÄT IN TRANSGENEN GEHÖLZPFLANZEN

Seit Mitte der 80er Jahre sind etwa 600 Publikationen zur genetischen Transformation von Gehölzpflanzen erschienen (inklusive Reviews sowie Symposiumsbeiträge, die in Spezialausgaben verschiedener Zeitschriften wie *Plant Physiology*, *Phytopathology* u.a. veröffentlicht wurden). Die Artikel betreffen insgesamt 43 Gattungen, wobei die Anzahl der Publikationen für die einzelnen Gattungen stark variiert (s. Tabelle 6). Die große Zahl von Berichten über Arten aus der Gattung *Populus* spiegelt die relativ leichte Transformierbarkeit der Mitglieder dieser Gruppe wieder. Relativ viele Veröffentlichungen finden sich noch bei *Carica*, *Citrus*, *Malus*, *Picea*, *Pinus*, *Prunus* und *Vitis*, während die restlichen Gattungen eher seltener, häufig nur 1-2 mal in der Liste vertreten sind. Der weitaus größte Teil der Publikationen beschreibt Untersuchungen zur Entwicklung oder Verbesserung der Transformationsmethode. Hierbei finden vorrangig die auch bei anderen Pflanzenarten üblichen Resistenzmarker *nptII*, *hpt* und *bar* sowie die Reportergene *nos*, *uidA* und *gfp* Verwendung. Wie bei krautigen Arten wird auch bei Gehölzarten hauptsächlich der CaMV35S-Promotor als 5'-regulatorische Sequenz zur Kontrolle der Transgen-Expression verwendet.

In Tabelle 6 werden ca. 100 Untersuchungen näher spezifiziert, in denen angewandte Aspekte verfolgt wurden. An der Spitze stehen hierbei Arbeiten zur *Virusresistenz*, die aufgrund der Bedeutung der durch Viren verursachten Schäden im Weinanbau und bei Obstbäumen bei Arten der Gattungen *Vitis*, *Prunus* und *Citrus* und Papaya vorrangig durchgeführt werden. Zur Erzeugung virusresistenter Linien werden die üblichen Strategien zur Co- oder *Antisense*-Suppression viraler Sequenzen, zumeist Coat-Protein-Gene, verfolgt.

Veränderungen des *Ligningehaltes* sind das Ziel von Untersuchungen bei Arten der Gattungen *Pinus* und *Populus*. Kiefern und Pappeln dienen als Rohstoff für die Papierherstellung, für die eine Extraktion der Ligninanteile erforderlich ist. Eine Reduzierung des Ligningehaltes oder eine Modifizierung der Ligninzusammensetzung, die die Etablierung energie- und umweltschonenderer Herstellungsverfahren ermöglichen würde, wird deshalb angestrebt. Auch hier wird über eine Co- und *Antisense*-Suppression versucht, die Expression von Genen, die für an der Synthese des Lignins beteiligte Enzyme codieren, zu unterdrücken (Baucher *et al.* 1998). Als leicht zu transformierende Gruppe sind verschiedene *Populus*-Arten auch bevorzugte Objekte in Untersuchungen zur Erzeugung insekten-, pilz-, und herbizidresistenter Linien. Einige Details hierzu sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Obwohl in nicht wenigen Veröffentlichungen zur Gehölztransformation darauf hingewiesen wird, dass eine hohe und langanhaltende Stabilität in der Ausprägung transgener Merkmale in diesen Organismen von besonderer Bedeutung ist, wurden bisher relativ wenige Untersuchungen zu dieser Fragestellung publiziert. Dies ist im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass sich bei vielen Gehölzarten aufgrund der langen Generationsdauer experimentelle Studien zumindest

Tabelle 6: Publikationen zur Transformation von Gehölzpflanzen seit 1985, numerische Übersicht zu anwendungsorientierten Arbeiten; Ges=gesamt, Vir=Virusresistenz, Ins=Insektenresistenz, Herb=Herbizidresistenz, Pilz=Pilzresistenz, Bakt=Bakterienresistenz, Wachs=verstärktes Wachstum, Ox=oxidativer Stress, Lig=Ligningehalt (Stand Juli 2001, Quellen s. Anhang).

Gattung	Ges	Vir	Ins	Herb	Pilz	Bakt	Wachs	Ox	Lig
<i>Acacia</i>	2								
<i>Actinidia</i>	1								
<i>Aesculus</i>	1								
<i>Betula</i>	10								
<i>Cacao</i>	6								
<i>Carica</i>	40	23 (ab)		1 (n)	1 (q)				
<i>Castanea</i>	1								
<i>Casuarina</i>	5								
<i>Citrus</i>	44	7 (c)	1 (k)						
<i>Coffea</i>	9		1 (k)						
<i>Cupressus</i>	2								
<i>Diospyros</i>	5		1 (k)						
<i>Eucalyptus</i>	12		1 (k)	1 (n)					
<i>Forsythia</i>	1								
<i>Hevea</i>	7								
<i>Hibiscus</i>	5		1 (k)						
<i>Juglans</i>	16		3 (k)						
<i>Kalmia</i>	1								
<i>Larix</i>	6		1 (k)	1 (o)					
<i>Liquidambar</i>	6		2 (km)						
<i>Malus</i>	44					1 (u)			
<i>Olea</i>	1								
<i>Opuntia</i>	1								
<i>Palm</i>	6								
<i>Papaya</i>	1								
<i>Picea</i>	27			2 (n)					
<i>Pinus</i>	51			1 (n)					
<i>Populus</i>	152	1 (d)	15 (kl)	6 (nop)	2 (rs)		1 (v)	1 (w)	14 (xyzz*)
<i>Prunus</i>	31	16 (e)							
<i>Pyrus</i>	11					1 (u)			
<i>Rhododendron</i>	5								
<i>Robinia</i>	3								
<i>Rosa</i>	11				1 (t)				
<i>Rubus</i>	13								
<i>Santalum</i>	1								
<i>Sesbania</i>	1								
<i>Solanum</i>	3								
<i>Taxus</i>	5								
<i>Tsuga</i>	2								
<i>Ulmus</i>	6								
<i>Vaccinium</i>	7		1 (k)						
<i>Verticordia</i>	1								
<i>Vitis</i>	46	8 (fghij)			1 (t)				

Virusresistenz (CP: Coat-Protein, VR: virale Replikase): **a)** PR(S)V Papaya Ringspot Virus (VR), **b)** PR(S)V Papaya Ringspot Virus (CP), **c)** CTV Citrus Tristeza Virus (CP), **d)** PMV Poplar Mosaic Carlavirus (CP), **e)** PPV Plum Pox Virus (CP), **f)** ArMV Arabis Mosaic Nepovirus (CP), **g)** GFLV Grapevine Fanleaf Virus (CP), **h)** GCMV Grapevine Chrome Mosaic Nepovirus (CP), **i)** GLrAV Grapevine Leafroll-associated Closterovirus (CP), **j)** TomRSV Tomato Ringspot Virus (CP), **Insektenresistenz:** **k)** Bt-Toxin, **l)** Proteinase-Inhibitoren, **m)** Tabak-Peroxidase, **Herbizidresistenz:** **n)** bar (Basta-Resistenz), **o)** aroA (Glyphosat-Resistenz), **p)** crs1-1 (Chlorsulfuron-Resistenz), **Pilzresistenz:** **q)** Stilbene-Synthase, **r)** Oxalat-Oxidase, **s)** Bacterio-Opsin, **t)** Chitinase, **Bakterienresistenz:** **u)** Attacin E, **verstärktes Wachstum:** **v)** Glutamin-Synthetase, **oxidativer Stress:** **w)** Glutathion-Reduktase, **Lignin-Modifizierung** (S/AS: Sense/Antisense-Suppression, Ü: Überexpression): **x)** 4-Coumarat-CoenzymeA-Ligase (S/AS), **y)** Caffeic Acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (COMT) (S/AS), **z)** Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase (CAD) (S/AS), **z*)** Ferulate 5-hydroxylase (Ü)

zur meiotischen (Trans)Gen-Stabilität kaum durchführen lassen. Dies erklärt die Dominanz von Daten und Erkenntnissen aus Untersuchungen an einjährigen, krautigen Modellpflanzen mit kurzen Generationsperioden wie Tabak, Petunie oder *Arabidopsis thaliana*. Aber auch zur mitotischen Stabilität, deren Untersuchung in vegetativ vermehrbaren Gehölzarten mit weniger Schwierigkeiten verbunden ist, wurden bislang kaum Daten publiziert.

Die einzigen Studien, in denen die Transgen-Expression über mehrere Jahre unter verschiedenen Bedingungen beobachtet und mit präzisen molekularbiologischen Analysen der transgenen Loci kombiniert wurden, stammen aus der Arbeitsgruppe von M. Fladung (Fladung *et al.* 1999, Kumar und Fladung 1999, 2000, 2001). Die Stabilität des morphologischen Markers *ro/C* unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors wurde in Langzeitversuchen über 5-6 Jahre in transgenen Hybrid- und Wild-Linien der Gattung *Populus* ermittelt. Insgesamt wurden 15 transgene Linien der Hybride *Populus tremula* x *P. tremuloides* und 7 transgene Linien der Wildart *Populus tremula* untersucht. Die Versuche ergaben:

- keine der *ro/C*-Hybridlinien und drei der Wildart-Linien zeigten während der *in vitro*-Kultur eine Suppression des *ro/C*-Gens,
- drei der *ro/C*-Hybrid-Linien und drei von fünf Wildart-Linien (zwei der sieben Linien waren in dieser Phase nicht mehr kultivierbar) zeigten eine unterschiedlich starke Inaktivierung des *ro/C*-Gens nach Überführung ins Gewächshaus,
- eine (aus der Gruppe der drei bereits im Gewächshaus instabilen Linien) von vier unter Freilandbedingungen aufgewachsenen Hybrid-Linien behielt auch unter diesen Bedingungen den revertierten, normalen Phänotyp bei; die einzige der transgenen Wildart-Linien, die sich unter Freilandbedingungen kultivieren ließ, exprimierte das *ro/C*-Gen stabil,
- die Integrationsorte der insgesamt vier von einem Merkmalsverlust betroffenen *ro/C*-Hybrid-Linien enthielten Sequenzwiederholungen (eine dieser Linien zeigte einen physischen Verlust der *ro/C*-Sequenz in Geweben und Organen mit hoher Frequenz); unter den *ro/C*-supprimierten Wildart-Linien fanden sich drei mit Sequenzwiederholungs-Strukturen, eine mit einer *single copy*-Integration in einen AT-reichen genomischen Bereich (s. Abschnitt 3.4.1), und zwei Linien mit *single copy*-Integrationen, die keine der bisher bekannten Eigenschaften aufwiesen, die mit einem *gene silencing* in Verbindung stehen – eine Erklärung für den Merkmalsverlust in diesen Linien steht noch aus.

Der hohe Anteil von *ro/C*-Wildtyp-Linien, die einen Verlust der Transgen-Expression aufwiesen, lässt die Autoren einen Einfluss des genetischen Hintergrundes auf das Ausmaß der Suppression vermuten (s. Abschnitt 3.9). Die Untersuchung von Kumar und Fladung (2001) zeigt darüber hinaus in anschaulicher Weise, wie viele verschiedene Phänomene der Transgen-Instabilität sich bereits bei der Analyse einer relativ kleinen Zahl transgener Linien identifizieren lassen.

Über mehrjährige Untersuchungen an transgenen Pappeln berichten auch Meilan *et al.* (2000), ohne allerdings nähere Details zu präsentieren. Insgesamt 70 Individuen von drei glyphosat-toleranten (CP4 und GOX) und 51 Individuen von vier insektenresistenten (Cry3a) Pappel-Linien wurden über zwei Jahre unter Freilandbedingungen getestet, in denen ein Verlust der transgen-vermittelten Merkmale offenbar nicht beobachtet wurde.

Langzeitstudien zur Expressions-Stabilität wurden darüber hinaus auch für transgene Apfel- (James *et al.* 1996) und *Citrus*-Linien (Cervera *et al.* 2000) beschrieben. James *et al.* berichten über die Expression des Nopalinsynthasegens und des *nptII*-Resistenzmarkers in 6 transgenen Linien über einen Zeitraum von 7 Jahren unter Gewächshausbedingungen sowie die stabile Vererbung der Transgene in zwei dieser Linien. Keine der Linien zeigte unter diesen Bedingungen einen Merkmalsverlust eines der beiden Gene. Cervera *et al.* (2000) beobachteten 70 transgene *Citrus*-Linien unter Freilandbedingungen über 4-5 Jahre. Die Linien enthielten das Reportergen GUS unter Kontrolle des 35S-Promotors und den Resistenzmarker *nptII* unter Kontrolle des nos-Promotors. Die Autoren fassen zusammen, dass (i) sämtliche Linien eine stabile Expression der Transgene über den beobachteten Zeitraum aufwiesen und (ii) Transgen-Umordnungen in den Integrationsorten nicht mit einem niedrigen Expressionslevel in Verbindung steht. Zur Evaluierung der Expressionstabilität wurde in bestimmten zeitlichen Abständen (ohne Angabe zur Häufigkeit) histochemische und in einigen Linien auch fluorometrische (quantitative) GUS-Assays vorgenommen, zu einem Zeitpunkt auch ein ELISA-Assay zur quantitativen *nptII*-Bestimmung. Gefunden wurde die übliche Variabilität zwischen den Linien bezüglich der GUS-Aktivität (Positionseffekt, s. Abschnitt 3.4.1), während die Höhe der Aktivität zumindest in den histochemischen Tests unverändert in Proben einer Linie über den getesteten Zeitraum erschien. Dies ließ sich jedoch nicht in quantitativen GUS-Bestimmungen verifizieren, in denen drastische Abweichung der GUS-Aktivität von bis zu 40% innerhalb der Proben einer Linie auftraten. Dieses Phänomen, das auf entwicklungsabhängige *gene silencing*-Effekte hindeutet, wurde allerdings nicht detaillierter untersucht.

Verschiedene Langzeituntersuchungen zur Transgen-Stabilität wurden darüber hinaus auch an *in vitro*-Kulturen durchgeführt. Über eine stabile GUS-Expression in Kalluskulturen über einen Zeitraum von 3 Jahren berichten Martinelli *et al.* (1994) für *Vitis rupestris* und Kokko *et al.* (1998) für *Rubus articus*. Ob aus den Ergebnissen solcher Untersuchungen Schlussfolgerungen bezüglich der Stabilität eines Transgens unter natürlichen Bedingungen abgeleitet werden können, ist fraglich.

Mit Ausnahme der Veröffentlichung von Fladung (1999) stand die Bedeutung somatischer Rekombinationsereignisse (s. Abschnitte 3.5/3.6) bislang nicht im Blickpunkt von Untersuchungen zur Transgen-Stabilität in Gehölzpflanzen. In Abschnitt 3.6 wurde bereits darauf hingewiesen, dass langlebige Organismen höhere Anforderungen an die mitotische Stabilität stellen und bezüglich dieses Themas Forschungsbedarf besteht.

Ein meiotischer Stabilitätsgrad wie im Fall 1-2jähriger Pflanzenarten, bei denen eine ausreichende Anzahl von Generationen in einem vertretbaren Zeitraum für entsprechende Tests zur Verfügung steht, lässt sich aufgrund der langen Generationsdauer vieler Gehölzarten bei Verwendung der gegenwärtig verfügbaren Transformationsmethoden kaum erreichen.

4.2 GEHÖLZPFLANZEN UND BIOLOGISCHES CONFINEMENT

Zwei Kategorien von Risiken sind bei der Ausbringung transgener Pflanzen in die Umwelt zu beachten:

- (i) Risiken, die aus der Übertragung der Transgene auf andere Organismen resultieren (vertikaler und horizontaler Gentransfer)
- (ii) Risiken, die mit den Eigenschaften der transgenen Organismen in Zusammenhang stehen (erhöhtes Verbreitungs- oder Eindringungspotential in natürliche oder künstliche Pflanzengemeinschaften, Produktion von Inhaltsstoffen mit Einfluss auf ökologische Prozesse oder nicht-Zielorganismen).

Die Wahrscheinlichkeit eines vertikalen Gentransfers hängt zum einen von der Existenz kreuzungskompatibler Arten und ihrer räumliche Entfernung zu den transgenen Individuen ab, zum anderen von der Distanz, die Pollen und/oder Samen der transgenen Arten zurückzulegen vermögen. Diese Parameter sind bei verschiedenen Gehölzarten in einer Weise ausgeprägt, die vor einem großflächigen Ausbringen transgener Individuen eine besondere Evaluierung der Situation erforderlich macht (Strauss *et al.* 1995/1999, James *et al.* 1998, Mullin und Bertrand 1998, Merkle und Dean 2000). Die folgenden biologischen Eigenschaften sind in diesem Zusammenhang von Relevanz:

- Gehölzarten weisen als sehr langlebige Organismen mit ausgedehnten vegetativen Phasen von einer bis mehreren Dekaden, ein sehr hohes Reproduktionspotential auf, in einigen Fällen, etwa bei Pappeln, mit der Fähigkeit verbunden, sich mit hoher Effektivität vegetativ zu vermehren (James *et al.* 1998),
- Häufiger als bei krautigen Nutzpflanzen finden sich im näheren Umkreis kreuzungskompatible Arten (Mullin und Bertrand 1998),
- Einige Baumarten sind als zweihäusige Arten reine Fremdbestäuber,
- Die Kombination aus Windbestäubung, großer Wuchshöhe und speziellen morphologischen Eigenschaften der Samen (Gewicht/Form) gewährleistet bei Waldbäumen eine weite Verbreitung sowohl des Pollens als auch der Nachkommen.

Darüber hinaus ist ein weiterer Umstand zu berücksichtigen, der das Eindringungspotenzial transgener Bäume in natürliche oder künstliche Pflanzengemeinschaften betrifft. Im Gegensatz zu 1-jährigen Nutzpflanzen, die zum Teil bereits seit mehreren Jahrtausenden gezüchtet und

angebaut werden, sind Bäume in einem weitaus geringerem Maße domestiziert. Im Verlauf von Züchtungsmaßnahmen gehen viele Eigenschaften, die ein Überleben unter natürlichen Bedingungen sicherstellen¹⁷, verloren. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass solche Nutzpflanzen auch als transgene Linien eher geringe Chancen besitzen, sich unkontrolliert zu verbreiten, selbst wenn sie mit Eigenschaften ausgestattet wurden, die ihnen eine größere biologische Fitness bieten. Waldbäume dagegen besitzen ein kaum durch menschliche Eingriffe modifiziertes Genom und damit noch alle Merkmale, die ein Überleben unter natürlichen Bedingungen garantieren. Bei einer Risikobewertung von Freisetzungen transgener Individuen solcher Arten sind deshalb andere Maßstäbe anzulegen.

Der Bedarf an Sicherheitsforschung ist offensichtlich, allerdings sind gleichfalls biologische Eigenschaften dafür verantwortlich, dass die erforderlichen Daten zu Ausbreitungsfrequenzen (Kiefern blühen nach 4-6, Pappeln nach 4-10 Jahren), oder zu Einflüssen auf das Ökosystem erst nach extrem langen Zeiträumen ermittelt werden können. Hinzu kommt, dass ein mechanisches *Confinement* solcher Bestände aufgrund der ausgeprägten Mobilität von Samen und Pollen nur schwer zu gewährleisten ist. Aus diesen Überlegungen heraus wurde schon 1995 von Strauss *et al.* vorgeschlagen, die wissenschaftlichen Arbeiten zur Erzeugung *steriler* Bäume durch gentechnische Verfahren zu intensivieren. Auf diese Weise soll ein biologisches *Confinement* erzeugt werden, welches die Verbreitung über Samen oder Pollen verhindert.

Auf natürlichem Wege entstandene Formen männlicher (Pollen-)Sterilität wurden bei einer Reihe von Pflanzenarten entdeckt und einige finden in der konventionellen Hybridzüchtung seit vielen Jahren Anwendung. Die für die Herstellung des Hybridsaatgutes erforderliche kontrollierte Bestäubung zwischen zwei Linien wird durch die Existenz pollensteriler Genotypen auch für Arten mit zwittrigen Blüten (bei Nutzpflanzen die Regel) möglich.

Ausreichend stabile Formen der Sterilität fanden sich allerdings nur bei wenigen Arten. Seit etwa 1990 wurden auf der Basis gentechnischer Methoden alternative Strategien zunächst mit dem Ziel verfolgt, die Vorteile der Hybridzüchtung auch für andere Pflanzenarten zu nutzen. Inzwischen werden diese Strategien aber auch als Grundlage für ein biologisches *confinement* transgener Pflanzen diskutiert (z.B. Strauss *et al.* 1995). Die bisher beschriebenen Ansätze lassen sich in zwei Gruppen einteilen: (i) Störung der Blüten- oder Pollenentwicklung durch die Aktivität cytotoxischer oder inhibierender Enzyme in Zellen und Geweben der Blütenanlagen und (ii) „Ausschalten“ pflanzeigener Gene, deren Expression für die Entwicklung von intakten Blüten oder Pollen essentiell ist, durch Co- oder *Antisense*-Suppression. Verschiedene Untersuchungen zu diesen Ansätzen werden hier kurz vorgestellt und in Tabelle 7 zusammengefasst.

¹⁷ Ein bekanntes und anschauliches Beispiel hierfür ist der Verlust der *Spindelbrüchigkeit* unserer heutigen Getreidearten. Die Samen sitzen an der Ähre fest – nur deshalb lassen sich Ernten effizient „einfahren“. Aufgrund der dadurch stark eingeschränkten Verbreitung der Samen wäre diese Eigenschaft für ein Wildgras dagegen von grossem Nachteil.

(i) Zell-Ablation durch die Aktivität cytotoxischer oder inhibierender Enzyme

Mariani *et al.* (1990) präsentierten erstmals Tabak- und Rapslinien, die eine auf diese Weise erzeugte männliche Sterilität aufwiesen. Die tapetum¹⁸-spezifische Expression (TA29-Promotor, Goldberg 1988) von RNasen aus *Bacillus amyloliquefaciens* (*barnase*) und *Aspergillus oryzae* (RNase-T1) verhinderte in diesen Linien die Pollenentwicklung. Das *barnase*-Gen aus *B. amyloliquefaciens* unter der Kontrolle eines *narben*spezifischen Promotors führte in entsprechender Weise in Tabak und *Arabidopsis thaliana* zu Bildung weiblich-steriler Blüten (Goldmann *et al.* 1994). Untersuchungen von Reynaerts *et al.* (1993) weisen allerdings bereits darauf hin, dass diese Gene unter Kontrolle des tapetum-spezifischen Promotors nicht in allen Pflanzenarten das gleiche Verhaltensmuster zeigen. In Blumenkohl (*Brassica oleracea*) und Chicorée (*Cichorium intybus*) bewirkte die Expression der *barnase* neben der Verhinderung der Pollenentwicklung auch Veränderungen in der Blütenmorphologie und eine Verschiebung des Blüh-Zeitpunktes. *Barnase*-Linien von *Lactuca sativa* wiesen dagegen ein reduziertes Wachstumspotential während der vegetativen Phase auf. Nicht untersucht wurde, ob derartige Abweichungen auf einer unterschiedliche Regulation des jeweiligen Promotors in den verschiedenen Arten beruhen. Dies vermuteten zumindest Thorsness *et al.* (1993) in ihren Untersuchungen zur Erzeugung steriler Pflanzen durch Expression des Gens für die Diphterietoxin-A-Untereinheit¹⁹ in Tabak und *Arabidopsis* (s. Tabelle 7). Pleiotrope Effekte können offensichtlich nicht nur bei Verwendung konstitutiver Promotoren auftreten (z.B. 35S-*rolC*), sondern auch beim Einsatz blütenspezifischer Promotoren, wenn sich diese in einem fremden genetischen Hintergrund befinden. Einen arteigenen Promotor (LEAFY) benutzten Nilsson *et al.* (1998) zur Expression des Gens für die Diphterietoxin-A-Untereinheit in *Arabidopsis*. Das LEAFY-Gen aus *Arabidopsis* wird während der frühen Blütenentwicklung exprimiert und stellt eines der homeotischen Gene dar, die die Entwicklung der Blüte entscheidend steuern (Weigel *et al.* 1992, s. auch Levy und Dean 1998). Die Blütenbildung war in diesen Linien vollständig unterdrückt. Um eine entsprechende Steuerung der Expression eines Cytotoxin-Gens in Pappeln realisieren zu können, isolierte die Arbeitsgruppe von Steven Strauss ein zur LEAFY-Sequenz homologes Gen aus *Populus trichocarpa* (PTLF, Rottmann *et al.* 2000). *In situ*-Hybridisierungen zeigten allerdings, dass die Expression von PTLF, anders als LEAFY in *Arabidopsis*, nicht auf das Blütenstadium beschränkt und der PTLF-Promotor sehr wahrscheinlich für die Herstellung steriler Pappeln ungeeignet ist.

(ii) Suppression pflanzeigener, blütenspezifischer Gene

Bei *Arabidopsis thaliana* und *Anthirrhinum majus* wurden mehrere Gene identifiziert, die an der Induktion und der Entwicklung von Blüten beteiligt sind (MADS-box-Gene, Übersichten bei Levy

¹⁸ eine der Ernährung der Pollen dienende Zellschicht im Inneren der Staubbeutel.

¹⁹ die Diphterietoxin-A-Untereinheit ist ohne die B-Untereinheit unfähig, das Cytoplasma einer Zelle zu verlassen oder in andere Zellen einzudringen. Eine Gefährdung anderer Organismen durch die Expression des entsprechenden Gens in transgenen Pflanzen ist auszuschließen (Pappenheimer 1977, Bellen *et al.* 1992).

Tabelle 7: Ansätze zur Erzeugung steriler Linien durch (i) Expression cytotoxischer Enzyme in Blütenorganen und (ii) Suppression pflanzeigener, blütenspezifischer Gene

Empfängerspezies	Promotor	Codierende Sequenz	Anmerkungen, Wirksamkeit	Referenz
(i) Expression cytotoxischer Enzyme in Blütenorganen				
<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Brassica napus</i>	TA29, Tapetum-spezifischer Promotor aus <i>Nicotiana tabacum</i>	- barnase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - RNase-T1 aus <i>Aspergillus oryzae</i>	- Erzeugung männlich-steriler Blüten, hohe Wirksamkeit bei Verwendung des barnase-Gens in der Mehrheit der transformierten Linien	Mariani <i>et al.</i> 1990
<i>Nicotiana tabacum</i>	A3/A9, Tapetum-spezifischer Promotoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	β -1,3-Glucanase	- Erzeugung männlich-steriler Blüten, hohe Wirksamkeit in wenigen Linien	Worral <i>et al.</i> 1992
<i>Brassica oleracea</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Lactuca sativa</i>	TA29, Tapetum-spezifischer Promotor aus <i>Nicotiana tabacum</i>	- barnase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - RNase-T1 aus <i>Aspergillus oryzae</i>	- Erzeugung männlich-steriler Blüten, pleiotrope Effekte bei Blütenbildung (<i>Brassica</i> , <i>Cichorium</i>) und reduziertes Wachstum während der vegetativen Phase (<i>Lactuca</i>)	Reynaerts <i>et al.</i> 1993
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	<i>rolC</i> aus <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	- Erzeugung männlich-steriler Blüten, hohe Effektivität, diverse pleiotrope Effekte: reduziertes Wachstum, Störung der Apikaldominanz, geringere Blattpigmentierung	Schmülling <i>et al.</i> 1993
<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	SLG, Promotor der codierenden Sequenz des S-Locus-Glycoproteins aus <i>Brassica oleracea</i> , aktiv im Narbengewebe und in Pollen	codierende Sequenz der Diphtherietoxin-A-Untereinheit	- Erzeugung weiblich-steriler Blüten, hohe Effektivität in einigen Linien, Pollen aufgrund der Aufspaltung des Transgens nur zu 50-75% steril, pleiotrope Effekte bezüglich der Blütenmorphologie bei <i>Arabidopsis</i>	Thorsness <i>et al.</i> 1993
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	Gen für (mitochondrien-codierte) ATPase-Untereinheit 9 aus <i>Triticum aestivum</i> , mitochondrialer Import durch <i>coxIV-targeting</i> Sequenz aus Hefe	Erzeugung männlich-steriler Blüten, hohe Effektivität in einigen Linien	Hernould <i>et al.</i> 1993
<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	STIG1, Narben-spezifischer Promotor aus <i>Nicotiana tabacum</i>	barnase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Erzeugung weiblich-steriler Blüten, hohe Effektivität in einigen Linien	Goldman <i>et al.</i> 1994
<i>Nicotiana tabacum</i>	Osg6B Promotor aus <i>Onyza sativa</i> Tapetum-spezifisch	β -1,3-Glucanase	Reduktion der Anzahl fertiler Pollen, keine vollständige Sterilität	Tsuchiya <i>et al.</i> 1995

Tabelle 7: Ansätze zur Erzeugung steriler Linien durch (i) Expression cytotoxischer Enzyme in Blütenorganen und (ii) Suppression pflanzeigener, blütenspezifischer Gene - Fortsetzung

Empfänger-spezies	Promotor	Codierende Sequenz	Anmerkungen, Wirksamkeit	Referenz
(i) Expression cytotoxischer Enzyme in Blütenorganen				
<i>Triticum aestivum</i>	pca55 aus <i>Zea mays</i> pE1 und pT72 aus <i>Oryza sativa</i> , Tapetum-spezifische Promotoren	barnase aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Erzeugung männlich-steriler Blüten, hohe Effektivität in der Mehrheit der transformierten Linien	de Block <i>et al.</i> 1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LEAFY-Promotor aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	codierende Sequenz der Diphterie-toxin-A-Untereinheit	vollständige Unterdrückung der Blütenbildung, hohe Effektivität in der Mehrheit der transformierten Linien	Nilsson <i>et al.</i> 1998
<i>Nicotiana tabacum</i>	Osg6B, Tapetum-spezifischer Promotor aus <i>Oryza sativa</i>	gAox, kerncodiertes Oxidasegen aus <i>A. thaliana</i> , <i>Antisense</i> -Suppression	Reduktion der Anzahl fertiler Pollen, keine vollständige Sterilität	Kitashiba <i>et al.</i> 1998
(ii) Suppression pflanzeigener, blütenspezifischer Gene				
<i>Petunia hybrida</i>	35S + "anther box" aus <i>Petunia hybrida</i>	Chalconsynthase cDNA, <i>Antisense</i>	Antheren ohne Pigmentierung und steril, hohe Wirksamkeit in einigen Linien	van der Meer <i>et al.</i> (1992)
<i>Petunia hybrida</i>	fbp1-Promotor	fbp1 (floral binding protein) aus <i>Petunia hybrida</i> , <i>Sense/Co</i> -Suppression	Abnormale Blütenentwicklung	Angenent <i>et al.</i> 1993
<i>Oryza sativa</i>	Ubiquitin-Promotor aus <i>Zea mays</i>	OsMADS3 (agamous), OsMADS4 (pistillata), aus <i>Oryza sativa</i> , <i>Antisense</i> -Suppression	Abnormale Blütenentwicklung, reduzierte Fertilität	Kang <i>et al.</i> 1998
<i>Nicotiana tabacum</i>	35S	kerncodiertes Gen für die 28,5kDa-Untereinheit des mitochondrialen Enzymkomplex I, <i>Antisense</i> -Suppression	Abnormale Blütenentwicklung, reduzierte Pollenfertilität	Schmidt-Bleek <i>et al.</i> 1999
<i>Petunia hybrida</i>	35S	pfg (Petunia flowering gene), <i>Sense/Co</i> -Suppression	Vollständige Unterdrückung der Blütenbildung in homozygoten Linien	Immink <i>et al.</i> 1999
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nin88	Nin88- <i>Antisense</i> (Nin88=extrazelluläre Invertase)	Pollenentwicklung gehemmt, keine 100% Suppression	Goetz <i>et al.</i> 2000

und Dean 1998, Pidkowich *et al.* 1999, Jack 2001). Gene mit hoher Sequenzhomologie wurden in der Folge auch in anderen Pflanzenarten gefunden, was auf eine starke Konservierung dieser Gene bezüglich Struktur und Funktion hindeutet. Die Suppression solcher Gene (*TAG1* aus Tomate, *fbp1* aus Petunie, *OsMADS3+4* aus Reis) durch Übertragung von *Sense*- oder *Antisense*-Konstrukten bewirkte starke Aberrationen bei der Blütenbildung und Sterilität (Angenent *et al.* 1993, Pnueli *et al.* 1994, Kang *et al.* 1998). Immink *et al.* (1999) beschrieben kürzlich ein neues blütenspezifisches MADS-box Gen aus *Petunia hybrida*, dessen Suppression den Verbleib der Pflanze im vegetativen Zustand bewirkt und die Blütenbildung verhindert.

In einem anderen Ansatz wird der Umstand genutzt, dass zur Entwicklung intakter Pollen die Anwesenheit bestimmter Flavonoide erforderlich ist, deren Bedeutung in diesem Zusammenhang allerdings bisher unbekannt ist. Van der Meer *et al.* (1992) fanden, dass die *Antisense*-Suppression der Chalcon-Synthase in Blüten transgener Petunien die Pigmentierung der Antheren verhindert und gleichzeitig eine Störung der Pollenentwicklung bewirkt (s. auch Ylstra *et al.* 1992, sowie die Patentschrift US 6005167/Van Tunen *et al.* 1999). Weitere Faktoren, deren Suppression die Bildung männlich steriler Blüten bewirkt, beschreiben Schmidt-Bleek *et al.* (1999) und Goetz *et al.* (2000). Goetz *et al.* (2000) isolierten die codierende Sequenz einer extrazellulären Invertase (*Nin88*) aus *Nicotiana tabacum*. Eine Suppression dieses Gens durch Übertragung eines *Antisense*-Konstruktes führte zu einem Block in einer frühen Phase der Pollenentwicklung und der Ausbildung männlich-steriler Blüten. Pleiotrope Effekte der *Nin88*-Suppression wurden nicht festgestellt.

Zur Etablierung eines biologischen *Confinements* stehen somit mehrere Varianten zur Verfügung, deren Effektivität in den jeweiligen Ziel-Organismen im einzelnen zu prüfen ist (bei Anwesenheit kreuzungskompatibler Individuen in der näheren Umgebung scheiden u.U. für bestimmte Gehölzarten diejenigen Ansätze aus Tabelle 7 aus, mit deren Hilfe sich männlich-sterile Individuen erzeugen lassen, da in diesem Fall eine Ausbreitung über transgene Samen nach wie vor stattfinden kann). Dass die Effektivität und z.T. auch pleiotrope Effekte in verschiedenen Arten in unterschiedlicher Weise ausgeprägt sind, ist aus biologischer Sicht nicht unbedingt überraschend, erschwert die Lage für eine Anwendung bei langsam wachsenden Gehölzpflanzen jedoch. Wünschenswert wäre die Verfügbarkeit arteigener Promotorsequenzen um Kompatibilitätsprobleme zwischen Transgen und dem genetischen Hintergrund zu umgehen. Die oben zitierte Arbeit von Rottmann *et al.* (2000) zeigt allerdings, dass die Identifizierung arteigener Sequenzen über Homologien zu bereits bekannten Genen aus Modellpflanzen nicht unbedingt erfolgreich sein muss. Der Aufwand, völlig neue blütenspezifische Sequenzen aus Gen-Bibliotheken von Waldbäumen zu „ziehen“, ist nicht unerheblich. Sind mehrere Promotor-Gen-Kombinationen zu testen, müssen darüber hinaus sehr effiziente Transformationssysteme zur Verfügung stehen – dies ist bislang nur bei Arten der Gattung *Populus* gewährleistet (s. Abschnitt 4.1). Nicht unterschätzt werden sollte auch der Zeitaufwand:

Bei Pappeln kann es u.U. 10 Jahren dauern²⁰, bis sich die Eigenschaft „steril“ überhaupt untersuchen lässt.

Es wurde in Abschnitt 4.1 schon darauf hingewiesen, dass die langen Wachstumsphasen bei Gehölzarten hohe Anforderungen an die mitotische Transgen-Stabilität stellen. Ein biologisches *Confinement* verlangt, dass zum Zeitpunkt der Blüte des Baumes sämtliche Gewebe, aus denen unter normalen Bedingungen Blüten oder Pollen hervorgegangen wären, einer entsprechenden Suppression unterliegen. Strauss *et al.* (1995) schlagen deshalb vor, eine hohe Stabilität des Merkmals „steril“ durch Übertragung mehrerer der oben genannten Genkassetten zu erreichen.

Auf einen u. U. destabilisierenden Faktor soll in Verbindung mit den unter Punkt (ii) beschriebenen Ansätzen an dieser Stelle hingewiesen werden: Co- und *Antisense*-Suppression beruhen auf Prozessen, die auf einem posttranskriptionalen *gene silencing* basieren. In Abschnitt 3.11.2 wurde auf die Tatsache hingewiesen, dass verschiedene virale Sequenzen bekannt sind, deren Aktivität eine Suppression des posttranskriptionalen *gene silencing* hervorrufen können, d.h. supprimierte endogene Sequenzen durch einen Virusbefall wieder aktiviert werden können (Marathe *et al.* 2000a, 2000b). Welche Bedeutung dieser Effekt im einzelnen besitzt und ob die Gen-Aktivität in Blütenanlagen davon betroffen sein kann, ist noch zu klären. Die Reaktivierung eines supprimierten Gens durch Virusbefall lässt sich durch Verwendung der kürzlich beschriebenen Promotor-dsRNA-Suppression (Promotor-RNAi) verhindern. Die Suppression beruht hier auf der Transkription invertierter Sequenzwiederholungen der 5'-regulierenden Sequenz des zu supprimierenden Gens (Mette *et al.* 2000). Die Suppression erfolgt in diesem Ansatz über ein transkriptionales *gene silencing*, das nach bisherigen Erkenntnissen nicht durch virale Suppressoren inhibiert wird (s. Abbildung 9, Sijen *et al.* 2001, Mette *et al.* 2001). Projekte, in denen diese Strategie bei der Erzeugung steriler *Populus*-Arten genutzt werden soll, sind bereits in Planung (Steven Strauss, persönliche Mitteilung).

Welche Erwartungen und Anspüche können an ein solches *confinement* gestellt werden? 100%ige Lösungen scheiden in biologischen Systemen aus, es geht demnach um eine *Minimierung* der Chancen einer Reversion zur fertilen Form. Eine solche Minimierung sollte erreicht werden durch:

- (i) Berücksichtigung des Vorschlages von Strauss *et al.* (1995), mehrere der oben beschriebenen Ansätze in einer Linie zu kombinieren,
- (ii): Vermeidung von homologen Sequenzabschnitten und Verwendung möglichst arteigener Promotoren für die Regulation des „gene of interest“ bei der Konstruktion der Transformationsvektoren,

²⁰ Nach Angaben von S. Strauss (pers. Mitteilung) existiert ein frühblühender *Populus alba*-Genotyp, an dem derartige Studien in kürzeren Zeiträumen durchgeführt werden können

- (iii) Durchführung präziser Analysen des transgenen Locus zur Auswahl von Klonen, in denen die Expression des Transgens *wahrscheinlich* über einen längeren Zeitraum stabil erhalten bleibt,
- (iv) Parallele Aufzucht einer größeren Zahl unabhängiger transgener Linien (die den Kriterien in (iii) entsprachen) bis zu Stadium der Blüte zur Selektion stabiler Varianten während mehrerer Entwicklungsphasen.

5 FORSCHUNGSBEDARF

Der großflächige und ständig wachsende Anbau transgener Sorten diverser ein- und zweijähriger Nutzpflanzen in verschiedenen Ländern zeigt, dass für einige aktuelle Anwendungen eine ausreichende Expressions-Stabilität von Transgenen besteht. Es ergeben sich jedoch eine Reihe von Fragen und ungelösten Problemen, wenn zur Zeit in der Erprobung befindliche oder geplante Nutzungen dieser Technologie betrachtet werden, zu denen auch das Konzept des biologischen *Confinements* zur Verhinderung der Ausbreitung transgener Pflanzen in natürliche Populationen gehört. In Zusammenhang mit der Anwendung solcher *Confinements* zur Reduzierung des Ausbreitungspotenzials von gentechnisch veränderten Gehölzpflanzen besteht Forschungsbedarf in mehrfacher Hinsicht:

- In den Abschnitten 3.10 und 3.11 wurde deutlich, dass bislang vergleichsweise wenig fundierte Daten zum Einfluss entwicklungsspezifischer sowie biotischer und abiotischer Umweltfaktoren auf die Stabilität transgener Merkmale ermittelt wurden. Die bisherigen Ergebnisse weisen auf die Bedeutung solcher Faktoren hin, allerdings wurden selten detaillierte Analysen zu der Art dieser Einflüsse vorgenommen. Erforderlich sind Untersuchungen, in denen unterschiedliche Bedingungen wie Temperatur, Licht, Stressfaktoren wie Pathogenbefall, Pflanzenschutzmitteleinsatz und Aufzuchtbedingungen gezielt in ihrer Wirkung auf die meiotische und die mitotische Stabilität hin getestet werden.
- Da Pflanzen im Gegensatz zu Säugetieren keine präformierte Keimbahn besitzen, können somatische Veränderungen, die vor der Blütenbildung im meristematischen Gewebe auftreten, an die nächste Generation weitergegeben werden. Die Fragestellung, in welchem Ausmaß sowohl epigenetische als auch genetische Veränderungen wie Mutationen und somatische, intrachromosomale Rekombinationsereignisse in langlebigen Organismen wie Gehölzpflanzen angereichert werden und welche Auswirkungen diese auf die Stabilität eines Merkmals ausüben können, ist noch weitgehend ungeklärt.
- Da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, dass die Wirksamkeit der für die Etablierung biologischer *Confinements* zur Verfügung stehenden Sterilitätsgene in verschiedenen Arten in unterschiedlicher Weise ausgeprägt sein können, sind die Sterilitätssysteme in den jeweiligen Ziel-Organismen im einzelnen zu prüfen. Es muss darüber hinaus auch untersucht werden, ob pleiotrope Effekte in Zusammenhang mit der Expression von Sterilitätsgenen auftreten. Veränderungen bezüglich des vegetativen Wachstumsverhaltens können unter Umständen das Ausbreitungspotential einer sich vegetativ vermehrenden Gehölzart beeinflussen.
- Wie in Kapitel 6.2 gezeigt wurde, basieren verschiedene Strategien zur Erzeugung steriler Linien auf einer Co- oder *Antisense*-Suppression blütenspezifischer Gene. Da diese Suppressionsmechanismen auf Prozessen des posttranskriptionalen *gene silencing*

beruhen, sind Interaktionen mit viralen Suppressor-Faktoren (Marathe *et al.* 2000a, s. Abschnitt 3.11.2) nicht auszuschließen. Inwieweit Viren eine Reversion der Blütensuppression verursachen können, muss im einzelnen evaluiert werden. Die Verwendung der auf einem transkriptionalen *gene silencing* beruhenden und nicht durch Viren beeinflussbaren Promotor-dsRNA-Suppression (Mette *et al.* 2001) ist in Betracht zu ziehen.

Darüber hinaus besteht ein allgemeiner Forschungsbedarf zum Thema *Transgen-Instabilität* in Zusammenhang mit den Methoden und Techniken der Genübertragung:

- Der nicht kontrollierbare Integrationsprozess bei der Herstellung transgener Pflanzen ist langfristig unbefriedigend. Seit vielen Jahren werden deshalb Untersuchungen zur homologen Rekombination durchgeführt, allerdings bisher ohne entscheidenden Durchbruch (Puchta und Hohn 1999). In neueren Ansätzen werden Strategien vorgeschlagen, in denen der Einsatz bakterieller Enzyme, die mit homologen Rekombinationsvorgängen in Verbindung stehen, die Frequenz der homologen Rekombination in Pflanzenzellen erhöhen soll (Shalev *et al.* 1999, s. Kumar und Fladung 2001). Ein weiterer Ansatz zur gezielteren Modifizierung pflanzlicher Gene besteht in der Verwendung chimärer Oligonucleotide (CO's, Hohn und Puchta 1999, Zhu *et al.* 2000).
- Unbefriedigend ist auch die nur bedingt zu kontrollierende Komplexität des transgenen Locus. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die bereits existierenden Transformationsmethoden durch verschiedene Maßnahmen mit einer größeren Präzision ausgestattet werden können. Hierzu zählen die Arbeiten von De Block *et al.* (1997, Verwendung des PARP-Inhibitors Niacinamid), Srivastava *et al.* (1999, Nutzung flankierender *lox*-Rekombinationssites zur Herstellung von *single-copy* Linien), und Fu *et al.* (2000, Verwendung von Genkassetten anstelle der üblicherweise eingesetzten Plasmide im direkten Gentransfer).
- Die Etablierung genauerer und gleichzeitig unkomplizierterer Methoden zur molekularbiologischen Analyse transgener Loci ist anzustreben, um Linien mit höherem Stabilitätsgrad selektieren zu können (z.B. Kumar und Fladung 2000, PCR-Technik zur Detektion von Sequenzwiederholungen).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stabilität transgener Merkmale besitzt nicht nur wirtschaftliche Bedeutung, sondern wird darüber hinaus auch zum Gegenstand sicherheitsbezogener Erwägungen, wenn der Verlust eine direkte oder indirekte Umweltwirkung hervorrufen kann. Ein Beispiel hierfür stellen Systeme zur Vermeidung der Ausbreitung von Transgenen über Samen oder Pollen dar, in denen die Blütenentwicklung durch die Expression bestimmter Sterilitätsgene verhindert werden soll. Die Etablierung eines solchen biologischen *Confinements* wird insbesondere in Zusammenhang mit der Freisetzung und Kommerzialisierung transgener Gehölzpflanzen diskutiert, da viele Arten dieser Gruppe ein sehr hohes Reproduktions- und Ausbreitungspotenzial besitzen. Voraussetzung für die Wirkungssicherheit von biologischen *Confinements* ist eine hohe Merkmalsstabilität der Sterilitätsgene.

Die vorliegende Literaturstudie befasst sich mit den Ursachen und Faktoren, die die Stabilität transgener Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen beeinflussen, sowie mit den gegenwärtig existierenden, auf gentechnischen Verfahren beruhenden Systemen zur Erzeugung steriler Pflanzen. Die Studie soll als Grundlage für die Erörterung der Fragestellung dienen, welche Erwartungen und Ansprüche an biologische *Confinements* durch die Übertragung von Sterilitätsgenen gestellt werden können, wie sich die Risiken einer Reversion zu fertilen Formen minimieren lassen und wo die Grenzen eines solchen Sicherheitskonzeptes liegen. In der Dokumentation berücksichtigt werden die Aspekte *Position und Komplexität des transgenen Locus, Transformationsmethode, Bedeutung des genetischen Hintergrundes und phylogenetischer Unterschiede zwischen Spender- und Empfängerorganismus, physischer Verlust von Transgen-Sequenzen, entwicklungsspezifische Einflüsse, biotische und abiotische Umweltfaktoren* sowie *Angaben zur Häufigkeit des Verlustes transgener Merkmale*. Die in Verbindung mit der Etablierung eines biologischen *Confinements* bestehende Sicherheitsrelevanz der Transgen-Stabilität erfordert auch die Einbeziehung von *Mutationen und Rekombinationseignissen*, die mit niedriger Frequenz natürlicherweise auftreten ($< 10^{-2}$, und daher in der konventionellen Züchtung ohne Bedeutung für die Bewertung der Sortenstabilität) und einen Ausfall der Genexpression verursachen können.

Aufgrund der langen Generationsdauer sind Gehölzarten für experimentelle Studien zur (Trans)Gen-Stabilität wenig geeignet – dementsprechend selten wurden Arten aus dieser Gruppe für Untersuchungen zur Genstabilität herangezogen. Wie in anderen Bereichen der pflanzlichen Biotechnologie dominieren auch hier Daten und Erkenntnissen aus Untersuchungen an einjährigen, krautigen Modellpflanzen mit kurzen Generationsperioden wie Tabak, Petunie oder *Arabidopsis thaliana*.

Hinsichtlich der Faktoren, die einen instabilisierenden Einfluss auf die Ausbildung eines Merkmals ausüben, bestehen zwischen transgenen und in der konventionellen Züchtung erzeugten Linien und Sorten keine *prinzipiellen* Unterschiede. Genetische Informationen

unterliegen fortwährenden Modifikationen wie **Mutationen und Rekombinationsereignissen**, und „unerwartete“ Änderungen der Ausprägung sowohl konventioneller als auch transgener Merkmale werden durch eine Vielzahl noch **unbekannter Regulationsprozesse** und Interaktionen zwischen genetischen Informationen,entwicklungsspezifischen Faktoren und Umwelteinflüssen hervorgerufen. Es ist allerdings zu beachten, dass bei der Übertragung fremder Gene in pflanzliche Zellen mit Hilfe der gegenwärtig verfügbaren Transformationstechniken eine „zufällige“, nicht kontrollierbare Integration bezüglich Position und Struktur des transgenen *Locus* (Ort oder Position eines Gens) in das Genom des Empfängerorganismus erfolgt. Derartige Ereignisse sind mit Translokationen vergleichbar, die in der konventionellen Züchtung bei einigen Arten zur Sortenentwicklung genutzt werden. Die hieraus resultierende hohe Komplexität des Integrationsortes mit Sequenzumlagerungen sowie Positionseffekte durch flankierende Bereiche des Empfängergenoms können einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Genexpression ausüben. Bei der Produktion transgener Pflanzen ist dieser Umstand systembedingt und führt dementsprechend häufig zu einer instabilen Ausprägung transgener Merkmale durch **epigenetisches gene silencing**.

(i) Mutationen und intrachromosomale, somatische Rekombinationsereignisse sind niedrigfrequente (10^{-4} – 10^{-7}), jedoch unvermeidbare Ereignisse. Da derartige Veränderungen mit dem Alter der Zellen und der Anzahl von Zellteilungen zunehmen, spielen diese Prozesse insbesondere bei langlebigen Organismen wie Gehölzarten eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass in Pflanzen keine speziellen Keimbahnzellen wie in tierischen Organismen existieren. In bestimmten Entwicklungsstadien erfolgt eine Umdifferenzierung des Apikalmeristems in ein Blütenmeristem und somatische Zellen differenzieren u.a. zu gametenbildenden Zellen. Auf diese Weise können genetische Veränderungen wie Mutationen in somatischen Zellen des Sprossmeristems an die Nachkommen weitergegeben werden.

Besitzt die gentechnisch veränderte Pflanze die Fähigkeit, sich vegetativ fortzupflanzen (etwa *Populus*-Arten) oder werden *in vitro*-Systeme zur Vermehrung von transgenen Linien benutzt (z.B. bei Obstgehölzen, Rosen), sind darüberhinaus auch Veränderungen in somatischen Zellen zu berücksichtigen, die nicht an der Gametenbildung beteiligt sind.

(ii) Zur (sehr heterogenen) Kategorie noch unverstandener Regulationsprozesse gehören z.B. Interaktionen zwischen viralen Faktoren und in der Wirtspflanze befindlichen Transgenen (Suppression der Co-Suppression, s.u.), die die Merkmalsausprägung negativ beeinflussen können, Interaktionen zwischen dem Transgen und dem genetischen Hintergrund des Empfängerorganismus, oder Beispiele, in denen die betreffende Transgen-Sequenz selbst die Eigenschaft besitzt, unter bestimmten Bedingungen mit einer Änderung des Expressionsverhaltens zu reagieren. Nur ein Bruchteil solcher Prozesse wurde bislang erforscht. Einige dieser Regulationsprozesse basieren wie diejenigen der dritten Gruppe auf epigenetischen Mechanismen der Gen-Inaktivierung (s.u.). Im Gegensatz zu diesen, auf den

Eigenschaften des „zufällig“ entstandenen Locus beruhenden *silencing*-Effekten, stellen die Merkmalsinstabilitäten der dritten Gruppe jedoch keine individuellen Eigenschaften einzelner Linien dar.

(iii) Änderungen der Genexpression durch epigenetisches *gene silencing* stehen mit Modifikationen der DNA durch Cytosin-Methylierung und/oder der molekularen Architektur des Chromatins in Verbindung. Epigenetische Prozesse werden u.a. als Schutzsystem gegenüber invasiver genetischer Informationen wie etwa Viren, springenden Genen und eben auch Transgenen gesehen. Aufgrund noch weitgehend unbekannter Signale und Mechanismen werden derartige Sequenzen häufig erkannt und „ausgeschaltet“. Die Mehrheit der im Labor hergestellten transgenen Linien verhält sich, in Abhängigkeit von der Struktur und der Position des transgenen Locus, in unterschiedlichem Ausmaß instabil bezüglich der Ausprägung des transgenen Merkmals, d.h. die Merkmalsinstabilitäten dieser Kategorie repräsentieren individuelle Eigenschaften einzelner Linien. Aus einer Population transgener Pflanzen lassen sich daher mehr oder weniger stabile Linien durch geeignete Ausleseverfahren ermitteln. Entwicklungsspezifische Faktoren und Umwelteinflüsse stehen auf noch weitgehend unbekannte Weise mit *silencing*-Effekten in Zusammenhang und können unerwartete Änderungen der Ausprägung des transgenen Merkmals bewirken. Solche Effekte wurden bislang relativ selten systematisch untersucht.

Der „zufällige“ Integrationsprozess bei der Herstellung transgener Pflanzen ist langfristig sowohl aus ökonomischer als auch aus ökologischer Sicht unbefriedigend. Seit vielen Jahren werden deshalb Untersuchungen zur *homologen* Rekombination durchgeführt, um eine zielgerichtete Integration der fremden Sequenzen zu erreichen, bisher allerdings ohne entscheidenden Durchbruch.

Die Merkmalsinstabilitäten der Kategorie (ii) sind unter Umständen kontrollierbar, wenn die zugrundeliegenden Regulationsvorgänge aufgeklärt wurden und geeignete Maßnahmen zur Erhöhung der Stabilität entwickelt werden konnten. Merkmalsverluste durch genetische Veränderungen der Kategorie (i) sind hingegen unvermeidbar. Bis zu einem gewissen Grad kontrollierbar sind Merkmalsinstabilitäten der Kategorie (iii) durch geeignete Ausleseverfahren. Im Fall 1-2-jähriger Nutzpflanzen, bei denen eine ausreichende Anzahl von Generationen in einem vertretbaren Zeitraum für entsprechende Tests zur Verfügung steht, lässt sich das Problem meiotischer Instabilitäten bis zu einem gewissen und aus ökonomischer Sicht ausreichenden Grad lösen, was u.a. auch der weltweit praktizierte Anbau gentechnisch veränderter Sorten erkennen lässt. Bei vielen Gehölzarten hingegen ist eine entsprechende Überprüfung der meiotischen Stabilität aufgrund der langen Generationsdauer kaum möglich. Ein meiotischer Stabilitätsgrad wie im Fall einjähriger Pflanzenarten lässt sich bei vielen Gehölzarten bei Verwendung der gegenwärtig verfügbaren Transformationsmethoden daher kaum erreichen. Die Überprüfung der mitotischen Stabilität transgener Merkmale in Gehölzen ist weniger problematisch, wenn die Möglichkeit zur vegetativen Vermehrung besteht. Allerdings

ist zu beachten, dass verschiedene Gehölzarten sehr langlebige Organismen mit ausgedehnten vegetativen Phasen von z.T. mehreren Jahrzehnten darstellen. In diesen Fällen ist auch die mitotische Stabilität nur begrenzt überprüfbar.

Die in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten, mit der Merkmalsverluste oder –änderungen auftreten, differieren zwischen 0,01 und 100% und decken damit die gesamte Bandbreite sämtlicher Formen von Instabilitäten ab, vom Funktionsverlust durch Mutationen bis zum vollständigem Expressionsverlust z.B. durch epigenetisches *gene silencing*. Daten zur Frequenz der Transgen-Instabilität lassen sich kaum verallgemeinern – eine Vielzahl von Besonderheiten der jeweiligen Untersuchung, der transformierten Pflanzenart, des übertragenen Gens sowie der zu bearbeitenden Fragestellung sind hierbei zu berücksichtigen. Festzustellen ist, dass

- in der Regel die Mehrheit der in einem Transformationsexperiment produzierten Pflanzen Instabilitäten aufweist,
- in der Gruppe der instabilen Linien eine (Trans)gen-Inaktivierung durch epigenetisches *gene silencing* mit einer Häufigkeit von bis zu 100% auftreten kann,
- sich aus transgenen Population weitgehend stabile Linien auslesen lassen, wobei die Effektivität dieser Auslese von der Größe der Population und der Generationsdauer des Empfängerorganismus abhängt, d.h. bei Pflanzenarten, die schwierig zu transformieren sind und/oder eine lange Generationsdauer besitzen, ist die Anwendung dieser Vorgehensweise eingeschränkt oder u.U. ausgeschlossen,
- auch im Fall zunächst stabiler Linien keine „Garantie“ für eine dauerhaft unveränderte Merkmalsausprägung besteht,
- die natürliche, genetische Variabilität durch Mutationen und Rekombinationsereignisse eine 100% Stabilität nicht zulässt. Mit einer Frequenz von 10^{-4} - 10^{-7} ist mit einem Ausfall eines Gens in Zellen und/oder Nachkommen zu rechnen.

Neben der Stabilität der Transgenexpression besitzt auch die Wirksamkeit der gegenwärtig verfügbaren Systeme zur Erzeugung steriler Pflanzen Einfluss auf die Effektivität eines biologischen *Confinements*. Die bisher verfolgten Ansätze lassen sich zwei Gruppen zuordnen: (i) Störung der Blüten- oder Pollenentwicklung durch die Aktivität cytotoxischer oder inhibierender Enzyme in Zellen und Geweben der Blütenanlagen und (ii) „Ausschalten“ pflanzeigener Gene, deren Expression für die Entwicklung von intakten Blüten oder Pollen essentiell ist, durch Co- oder *Antisense*-Suppression. Für jede Gruppe stehen mehrere Varianten zur Verfügung, deren Effektivität in den jeweiligen Ziel-Organismen jedoch zuvor im einzelnen zu prüfen ist, da in bisherigen Untersuchungen an verschiedenen Modellpflanzen bereits Unterschiede in der Wirksamkeit festgestellt wurden. Berücksichtigt werden muss im Fall der unter Punkt (ii) beschriebenen Ansätze zur Co- und *Antisense*-Suppression, dass virale

Faktoren eine Inhibierung dieser auf posttranskriptionalen *gene silencing*-Prozessen beruhenden Systeme hervorrufen können.

Auch wenn der großflächige Anbau transgener Sorten diverser einjähriger Nutzpflanzen zeigt, dass derzeit für einige Anwendungen eine ausreichende Transgen-Stabilität besteht, ergeben sich jedoch eine Reihe von Fragen, wenn z.Z. in der Erprobung befindliche oder geplante Nutzungen dieser Technologie, etwa die Etablierung eines biologischen *Confinements*, betrachtet werden. Hierzu besteht Forschungsbedarf in den Bereichen Transformationstechnik, Einfluss durch endogene und exogene Faktoren, Bedeutung niedrigfrequenter genetischer Veränderungen für langlebige Gehölzarten sowie der Wirksamkeit der Systeme zur Sterilitätserzeugung.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist von einer nur begrenzten Wirksamkeit biologischer *Confinements* bei vielen Gehölzarten auszugehen. Auf der Basis methodischer Verbesserungen und neuer Erkenntnisse über beeinflussende Faktoren ließe sich eine Steigerung der Wirksamkeit durch geeignete Maßnahmen erzielen. Neben der Durchführung entsprechender Forschungsaktivitäten wird darüber hinaus vorgeschlagen, den kombinierten Einsatz mehrerer Systeme zur Sterilitätserzeugung in Betracht zu ziehen, um eine höchstmögliche Wirksamkeit des *Confinements* zu erreichen.

7 SUMMARY

The stability of a “gene of interest” is of economic importance, but may become also relevant to safety considerations when its loss involves a direct or indirect influence on the environment. Examples are biological systems that avoid the spread of transgenic seeds or pollen by inhibiting the development of flowers due to expression of certain genes for sterility. Establishing such biological *confinements* is discussed in the context of release and commercialisation of transgenic woody plants, since many species of this group possess a great potential for reproduction and propagation into natural populations by means of their biological properties. Prerequisite for the effectiveness of biological *confinements* is a high stability for the expression of sterility-genes.

This study deals with the causes and factors, which influence the stability of transgenic traits in genetically modified plants, and the currently available systems for the production of sterile plants. This supplies a base for addressing the question of which expectations and demands on biological *confinement* by transfer of sterility-genes are realistic, and how the chance and probability of reversion to fertile forms can be minimized. Aspects on *position and complexity of transgene locus, transformation method, importance of the genetic background and phylogenetic differences between donor and recipient organism, physical loss of transgene sequences, development-specific influences, biotic and abiotic environmental factors* as well as *data on frequency of a transgene loss being lost* are considered in the documentation. The relevance of safety in terms of transgene stability associated with the concept of biological *confinement* has to include naturally occurring *mutations and recombination events* that can provoke changes in nucleotide sequence at low frequency ($< 10^{-4}$, and therefore insignificant with regard to stability of commercial varieties) and cause a loss of gene expression.

The long generation period makes woody species less suitable for experimental studies on (trans)gene-stability – only a small number of publications have therefore addressed this question in respect to transgenic woody plants. This explains the dominance of data and informations from investigations on annual, herbaceous species like tobacco, petunia and *Arabidopsis thaliana* in this paper.

With regard to factors having a destabilizing influence on the expression of a trait, there are no *essential* differences between transgenic and non-transgenic plants. Genetic information is continuously subjected to modification by **mutation and recombination**, and “unexpected” changes in expression of conventional as well as transgenic characters are induced by a vast number of still **unknown regulatory processes** and interactions between genetic information, development-specific factors and environmental influences. However, one has to consider that by transferring additional genes into plant cells using the currently available transformation techniques a “random”, uncontrollable integration with respect to position and structure of the transgene locus occurs into the genome of the recipient organism. Such events are comparable

to translocations that are used in classical breeding for developing new varieties in some species. Sequence rearrangements and position effects resulting from such integration events can have a negative influence on gene expression and stability of the transgenic character through **epigenetic gene silencing**.

(i) Mutations and intrachromosomal somatic recombination events are processes that evoke changes in DNA sequence. These occur at a fairly low frequency (10^{-4} – 10^{-7}), but nevertheless are unavoidable events. Since such genetic changes increase with the age of cells as well as with the number of cell-divisions, these events will have a significant impact on transgene stability in long-living organisms like woody plants. It has to be considered, that plants do not possess specialised germline-cells like animals. At defined developmental stages apical meristems differentiate to flower meristems and certain somatic cells to gamete-forming cells. Thus genetic changes in somatic cells can be passed on to progeny if gamete-forming cells of a shoot meristem are affected. Moreover, genetic changes in somatic cells that are not involved in gamete-development are to be considered in vegetatively propagating species (e.g. *Populus*) as well as in cases, where *in vitro* systems are used for propagation of transgenic lines from leaf tissue as commonly practised in some woody species (i.e. fruit trees, roses).

(ii) The second category is highly heterogeneous – it includes for example interactions between viral factors and transgenes of the host plant (suppression of co-suppression, see below), that can influence gene expression, interactions between the transgene and the genetic background of the target organism, or examples in which the respective transgene sequence itself harbours the property to react by changed expression pattern under certain conditions. Only a small fraction of such processes have been investigated up to now. Some of these regulatory processes are based on epigenetic mechanisms of gene inactivation as those described in category (iii). However, in contrast to these, instabilities of category (ii) do not represent individual features of single transgenic lines.

(iii) Changes in gene expression due to epigenetic *gene silencing* are linked to modifications of DNA by cytosine methylation and/or the molecular architecture of chromatin. Among other functions, epigenetic processes are interpreted as a protection system against invasive genetic information like viruses, “jumping genes” (transposons) and also transgenes. By mostly still unknown signals and mechanisms such “alien” sequences are often recognized and “turned off”. The majority of transgenic lines produced in laboratories are unstable with respect to the expression of the transgenic trait, depending on structure and position of the transgene locus, i.e. instabilities of this category represent individual features of single lines. Thus, (more or less) stably expressing transgenic lines can be selected out of a population of transformants (see below). Development-specific and environmental factors can trigger *silencing* effects in unknown ways and probably cause unexpected changes of transgene expression. Such effects have been investigated only rarely.

In the long run, the current state of „random“ transgene integration during the generation of genetically modified plants is dissatisfactory. Therefore, studies on *homologous* recombination have been conducted for several years, yet without crucial success.

Instabilities of transgenic traits of category (ii) are controllable, if the underlying regulation processes were cleared up and suitable measures were developed to increase the stability of gene expression, whereas loss of transgenic traits due to genetic modifications of category (i) are unavoidable. Gene silencing effects of category (III) are controllable to a certain degree if suitable selection procedures can be applied. In annual or biennial crops, in which a sufficient number of generations is available for respective tests within a reasonable time frame, meiotic instabilities can be controlled to a certain, economically acceptable degree, verified by the worldwide practised cultivation of genetically modified varieties. Testing for meiotic stability of a transgenic trait is impeded however, in many woody species due to the long generation periods. The level of meiotic stability that is common for annual plant species can therefore hardly be achieved in woody species. The examination of mitotic stability of transgenic traits in woody plants is less challenging, if the possibility of vegetative propagation exists. However, one should consider that certain species represent extremely long-living organisms with expanded vegetative phases of several decades. In these cases also mitotic stability is controllable to a limited degree only.

Published data on frequency with which loss or change of (trans)gene expression occur, vary from 0,01 to 100%. and thus cover the entire bandwidth of manifestations of instabilities, from loss of function by mutation to complete loss of expression e.g. by epigenetic *gene silencing*. Data on frequency of transgenic trait losses can hardly be generalized - a multiplicity of special features of the respective investigation, the transformed plant species, the transferred gene(s) as well as the scientific subject have to be considered. From the current stage of knowledge it can be stated, that

- usually the majority of a (nonselected) population of transgenic plants produced in a transformation experiment behaves unstable concerning transgene expression,
- within the group of unstable lines transgene inactivation by epigenetic gene silencing occurs with a frequency of up to 100%,
- from a population of transgenic plants stable lines can be selected, whereby the efficiency of this selection depends on the size of the population and the generation time of the recipient organism, i.e. plant species, which are difficult to transform and/or possess a long generation time, the application of this procedure is restricted or even impossible,
- also in case of initially stable lines a " warranty " for a permanently unchanged trait stability does not exist,

- natural variability, i.e. the occurrence of mutations and recombination events does not permit 100% stability. With a frequency of 10^{-4} - 10^{-7} the loss of expression of a given (trans)gene in cells and/or progenies is to be expected.

Besides the stability of transgene expression, effectiveness of currently available systems for the production of sterile plants also has an influence on the efficiency of biological *confinement*. All previous approaches can be assigned into two groups: (i) Disturbance of flower and pollen development due to activity of cytotoxic or inhibiting enzymes in cells and tissue of flowerprimordials and (ii) “knock-out” of endogenous plant genes whose expression is essential for the development of intact flowers or pollen by means of co- or *Antisense*-suppression. For each group several variants are available, but efficiency in the respective target organisms needs to be determined individually, since differences in effectiveness have been demonstrated in several model species.

Even though the extensive cultivation of transgenic varieties of various annual crops shows that there is a sufficient transgene stability for some applications, a number of questions and unsolved problems arise, when application of this technology currently being tested or planned, e.g. the concept of biological *confinement*, are considered. A demand for research is obvious in several areas: transformation technology (targeted integration by homologous recombination, diminishing the complexity of transgenic loci, increasing the efficiency of transformation systems), significance of endogenous and exogenous factors for gene-stability (genetic background, development-specific as well as biotic and abiotic environmental factors), significance of low frequent genetic modifications for long-lived woody species as well as the effectiveness of the systems for sterility.

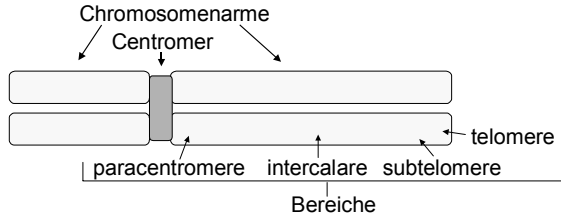
At this time biological *confinement* strategies will have only limited effectiveness in many woody species. Based on methodical improvements and new findings concerning the factors affecting gene stability an improvement of the effectiveness can be obtained by suitable measures. Apart from appropriate research activities it is suggested to consider the combined application of several systems to generate sterility, in order to achieve a highest possible effectiveness of biological *confinements*.

8 GLOSSAR

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Das gram-negative Bodenbakterium <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermag durch Einschleusen eines Stückes seiner Erbsubstanz (T- oder Transfer-DNA), Pflanzenzellen derart umzuprogrammieren, dass diese zum einen ein tumoröses Wachstum entwickeln, zum anderen bestimmte Nährstoffe für die Bakterien produzieren. In dem sich entwickelnden Pflanzentumor können sich die Bakterien ansiedeln und vermehren. In den 70er Jahren war es gelungen, den Mechanismus dieses natürlichen Gentransfer-Systems in den wesentlichen Zügen aufzuklären. Nachdem man die für die Tumorbildung verantwortlichen Gene mit Hilfe molekularbiologischer Techniken „herausgeschnitten“ und gleichzeitig durch neue, z.B. Antibiotikaresistenz-vermittelnde Gene ersetzt hatte, ließen sich mit Hilfe dieses Systems gentechnisch veränderte, morphologisch aber normale Zellen herstellen. Wie man anschließend aus solchen Zellen intakte Pflanzen regeneriert, war zuvor in einem benachbarten Forschungsgebiet, der pflanzlichen Zell- und Gewebekultur, ermittelt worden.
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	wie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> induziert auch <i>A. rhizogenes</i> die Bildung von Tumoren, die hier jedoch einen „wurzeligen“ Charakter besitzen. Diese Tumorform wird durch die Aktivität der <i>rol</i> -Gene hervorgerufen.
Antheren-Kultur	Durch Kultivierung von Antheren (Staubgefäßen) auf speziellen Kulturmedien lassen sich bei manchen Pflanzenarten aus (den haploiden) Pollen haploide Pflanzen regenerieren.
Antisense-Suppression	Bezeichnung für die Strategie, ein endogen bereits vorhandenes Gen durch Übertragung der gleichen Sequenz in Gegenorientierung auszuschalten (siehe <i>homology dependent gene silencing</i>).
<i>backbone</i> -Sequenzen	Sequenzbereich eines Plasmids oder Transformationsvektors, der die grundlegenden Funktionen zur Replikation und Vermehrung (Replikationsursprung und bakterieller Selektionsmarker) in der Bakterienzelle enthält. Bei Binärvektoren für den <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Gentransfer die außerhalb der T-DNA liegenden Sequenzbereiche.
Cis-Inaktivierung	Inaktivierung eines Gens durch den Einfluß benachbarter Sequenzelemente, Faktoren, Methylierungsmuster oder DNA-Tertiärstrukturen (Chromatin).
<i>codon usage</i>	Der genetische Code (die Abfolge von drei Nucleotiden enthält als Triplet oder Codon die Information für den Einbau einer bestimmten Aminosäure während der Translation) ist zwar universell, bezüglich des <i>codon usage</i> können jedoch Unterschiede zwischen verschiedenen Organismen existieren. Bei 61 Codon-Varianten (drei der insgesamt 64 möglichen Abfolgen werden als Start- und Stopp-Codons benutzt) stehen für jede der 20 Aminosäuren jeweils mehrere Codons zur Auswahl. Der Begriff <i>codon usage</i> beschreibt das Phänomen, dass diese Codon-Varianten von verschiedenen Spezies mit unterschiedlicher Frequenz verwendet werden. Werden z.B. bakterielle Gene in Eukaryoten übertragen, muß u.U. eine Anpassung des <i>codon usage</i> an den Empfängerorganismus vorgenommen werden.

<i>Confinement</i>	(auch: <i>Containment</i>) Be- bzw. Eingrenzung der Ausbreitung eines Organismus bzw. seiner Gene über Pollen, Samen oder vegetative Vermehrung. Die Eingrenzung kann vorgenommen werden mittels (i) physikalisch chemischer Maßnahmen (z.B. Anbau in Isolationshäusern, Eintüten oder Entfernen von Blütenständen) oder (ii) biologischer Maßnahmen (z.B. Unterdrückung der Blütenbildung durch Suppression von Genen, welche die Entwicklung der Blüte oder von Blütenorganen steuern). Eine Übersicht zu Confinement-Maßnahmen findet sich bei Zoglauer et al. (2000)
Co-Suppression	Bezeichnung für die Strategie, ein endogen bereits vorhandenes Gen durch Übertragung der gleichen Sequenz auszuschalten (siehe <i>homology dependent gene silencing</i>).
Cre-lox	Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1, das aus den Komponenten Cre-Rekombinase (<i>cyclisation recombination</i>) und den 34bp lox Erkennungssequenzen (<i>locus of crossing over</i>) besteht. Bei Anordnung von zwei lox-Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung werden sie von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten, inclusive der dazwischenliegenden Bereiche.
Ektopisch, ektopische Paarung	ektopisch bedeutet „an untypischer Stelle“. Der Begriff wird verwendet (i) für Transgene, die sich nicht am natürlichen Genort, d.h. in einem unnatürlichen genetischen Kontext befinden (dies trifft für Transgene in Pflanzen i.d.R. zu, da hier eine Integration durch illegitime Rekombination erfolgt), (ii) in Zusammenhang mit der Paarung homologer Sequenzen, ektopische Paarung vs. allelische Paarung.
<i>Enhancer</i>	Bezeichnung für relativ kurze genetische Elemente, die die Expression von Genen verstärken können. <i>Enhancer</i> verbessern die Erkennung des Promotors durch die RNA-Polymerase. <i>Enhancer</i> können vor (häufiger) oder hinter dem beeinflussten Gen liegen.
epigenetisch, epigenetische Genregulation bzw. Regulationsprozesse	Der Begriff „epigenetisch“ umschreibt den Informationsgehalt eines Genoms, der nicht in Form der primären Nukleotidsequenz vorliegt. Änderungen der Genexpression ohne Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen auf epigenetischen Regulationsprozessen. Die Regulation findet in diesem Fall auf einer oberhalb der DNA-Sequenzinformation liegenden Ebene statt und erfolgt durch die DNA-Modifikation durch Cytosin-Methylierung sowie durch Chromatin-remodelling, d.h. Änderungen der molekularen Architektur des Chromatins, die die Aktivität von Genen beeinflussen können.
Epigenetisches <i>gene silencing</i>	s. <i>gene silencing</i> .
Epimutation	Änderungen der Genexpression ohne Veränderungen der DNA-Sequenz (<i>gene silencing</i> aus der klassischen Genetik).
Expressivität	Ausmaß oder Umfang, mit dem sich ein Allel phänotypisch manifestiert; wird durch andere Gene und deren Produkte sowie durch äußere Faktoren beeinflusst.

<i>Gene silencing</i>	Verringerung oder vollständiger Verlust der Expression eines Gens, ohne dass Änderungen seiner BaSensequenz (wie bei Mutationen oder Rekombinationsereignissen) stattgefunden haben. Das <i>gene silencing</i> wird deshalb den epigenetischen Regulationsprozessen zugeordnet (deshalb auch häufig als epigenetisches <i>gene silencing</i> bezeichnet). <i>Gene silencing</i> kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen, die die Expression entweder durch Unterdrückung der Transkription (<i>transkriptionales gene silencing</i>) oder durch Degradierung der Boten- oder mRNA (<i>posttranskriptionales gene silencing</i>) des entsprechenden Gens verhindern.
homo-, hetero, hemizygot	In diploiden Organismen können sich an einem Genort auf beiden homologen Chromosomen gleiche (homozygot, reinerbig) oder unterschiedliche (heterozygot, mischerbig) Formen (Allele) eines Gens befinden. Befindet sich ein Allel nur auf einem der beiden homologen Chromosomen (wie z.B. in Primärtransformatanten), bezeichnet man das Individuum als hemizygot.
<i>homology dependent gene silencing</i> (HDGS)	Ein <i>gene silencing</i> kann bei Anwesenheit gleicher (homologer) DNA- oder komplementärer RNA-Sequenzen in einer Zelle durch eine Interaktion zwischen diesen Sequenzen ausgelöst werden (DANN-Sequenzen können benachbart sein oder im Genom weit voneinander entfernt vorliegen). Homologe Sequenzen können miteinander durch allelische (siehe Paramutation) oder ektopische Interaktion auf DNA-Ebene sowie nach Bildung komplementärer (<i>Sense/Antisense</i>) oder selbst-komplementärer (<i>inverted repeat</i>) mRNA-Moleküle interagieren. Alle Interaktionen können ein <i>gene silencing</i> auslösen.
homologe Rekombination	“Normale” Rekombination, die auf der Existenz von Sequenz-homologien beruht.
horizontaler Gentransfer	Die Weitergabe bzw. Aufnahme genetischer Information außerhalb der sexuellen Fortpflanzungswege und unabhängig von bestehenden Artgrenzen.
Hybrid-Züchtung	Aus Kreuzungen verschiedenartiger Eltern können Nachkommen (Hybride) entstehen, die eine erhebliche Leistungssteigerung gegenüber den Ausgangseltern aufweisen. Man spricht von einem Heterosiseffekt, dessen Ursachen bislang nicht aufgeklärt wurden. Kreuzungen dieser Art wurden erstmals 1908 von G.M. Shull mit Mais-Linien durchgeführt.
illegitime Rekombination	Rekombinationsereignis von geringer Frequenz, das ohne Anwesenheit homologer Sequenzen stattfinden kann (u.U. bei Mikrohomologien von wenigen Basenpaaren).
Imprinting (genomisches)	Begriff, der die Vererbung eines inaktiven oder eines aktivierbaren Zustandes von Genen mütterlicherseits oder väterlicherseits an die nächste Generation beschreibt.
intrachromosomale Rekombination	Rekombinationsereignis zwischen homologen Bereichen eines DNA-Stranges.

intercalare (und paracentromere) Chromosomenbereiche	Zur Lokalisierung von Banden oder Bandenmustern und Genen (durch Fluoreszenzmarkierung <i>in situ</i> nachweisbar) werden die Chromosomenarme in verschiedene Bereiche eingeteilt:  Das Diagramm zeigt ein Chromosom mit einem zentralen Centromer. Die Arme sind in drei Bereiche unterteilt: paracentromere (nahe dem Centromer), intercalare (in der Mitte) und subtelomere (nahe dem Ende). Die gesamte Länge ist als Chromosomenarm bezeichnet. Die Enden sind als telomere markiert.
Isochore	Pflanzengenome bestehen aus Mosaiken von DNA-Segmenten mit übereinstimmenden GC-Gehalt, die als Isochore bezeichnet werden
Locus	Ort eines Gens oder einer anderen definierten Sequenz auf einem Chromosom.
MADS-box Gene	Die MADS-box-Genfamilie codiert für Transkriptionsfaktoren, die eine übergeordnete Funktion bei der Entwicklung von Organen besitzen bzw. die Identität von Organen während der Entwicklung festlegen. Die Gene besitzen eine gemeinsame, spezifische Sequenz, die MADS-box, deren Bezeichnung auf die ersten vier identifizierten Gene dieser Art zurückgehen: M CM1, A gamous, D eficiens und S RF (Schwarz-Sommer et al. 1990).
meiotische Stabilität	Stabilität eines Gens im Verlauf der Meiose.
mitotische Stabilität	Stabilität eines Gens im Verlauf mitotischer Zellteilungen.
paracentromere Chromosomenbereiche	s. intercalare Chromosomenbereiche.
Paramutation	Die Mendelschen Regeln basieren u.a. auf der Annahme, dass sich unterschiedliche Allele nicht gegenseitig beeinflussen. In Mais wurde jedoch bereits vor etwa 50 Jahren ein Locus identifiziert, dessen Allele sich in ihrer Ausprägung gegenseitig beeinflussen konnten. Die Änderung der Ausprägung war vererbbar, aber nicht stabil und konnte nach einigen Generationen wieder zur ursprünglichen Ausprägung revertieren. Es handelte sich daher nicht um eine durch Mutation hervorgerufene Änderung der Basensequenz (daher <i>Paramutation</i>). Die Paramutation beruht auf einer allelischen Interaktion, die auch in transgenen Pflanzen zur Inaktivierung von Genen geführt hat (s. auch ekto-pische Interaktion).
Para-Retroviren (s.auch revers transkribierte Elemente)	Es existieren zwei Hauptgruppen von Para-Retroviren, die Caulimo-Viren und die Badna-Viren. Caulimo-Viren befallen Erdnüsse, Soja, Cassava und Arten der Gattung Brassica, Badna-Viren infizieren Bananen, Kakao, Citrusfrüchte, Ananas und Zuckerrohr. Bezüglich des Replikationsvorgangs und der Expression ihrer Gene unterscheiden sich beide Typen kaum voneinander. Die im Kern aus dem Capsid entlassene, ringförmige DNA wird zunächst in RNA umgeschrieben. Nach Verlassen des Kerns dient diese RNA als Boten-RNA zur Herstellung von Capsid-Proteinen sowie einer reversen Transcriptase, die für die Produktion neuer viraler DNA-Moleküle sorgt.

Partikel-Kanone (<i>particle gun</i>)	Hierzu werden ca. 1 Mikrometer (1/1000 mm) große Partikel aus Wolfram oder Gold mit DNA „ummantelt“, d.h. die DNA wird in Anwesenheit der in Suspension befindlichen Partikel gefällt und bindet an die Oberfläche der Partikel. In einer speziellen Apparatur werden die mit der genetischen Information versehenen Partikel anschließend durch Heliumdruck in die Zellen des Zielgewebes, die einen Durchmesser von ca. 30-100 Mikrometer aufweisen, „geschossen“ (getroffene Zellen können die von den Partikeln durchdrungene Zellwand u.U. wieder reparieren).
Penetranz	Merkmalsausprägung eines Gens in einer Population.
Polyadenylierung	Anhängen von ca. 200 A-Basen ans 3'Ende der mRNA bei der Reifung (wichtig für die Stabilität des Transkripts).
Positionseffekt	Beeinflussung des Expressionslevels eines Gens durch den genomischen Kontext
<i>Posttranskriptionales gene silencing</i> (PTGS)	Die Inhibierung der Expression eines Gens findet auf posttranskriptionaler Ebene statt. Das Gen wird transkribiert, die Boten bzw. mRNA wird jedoch degradiert, bevor es zur Translation kommt.
Primärtransformanten	Bezeichnung für die aus einem Transformationsexperiment direkt hervorgegangenen transgenen Klone oder Pflanzen, auch als T0- oder R0-Generation bezeichnet. Vegetativ vermehrte Arten verbleiben oft in diesem Stadium, z.B. Kartoffeln. Im Fall der über Samen vermehrten Arten werden die nachfolgenden Generationen mit T- oder R1/R2/R3 usw. bezeichnet.
Promotor	Als Promotor (oder 5'-regulatorische Sequenz) bezeichnet man den vor einem Gen (5'- <i>upstream</i>) liegenden DNA-Abschnitt, in dessen Bereich die RNA-Polymerase, die eine Kopie des Gens in Form eines RNA-Stranges erzeugt, bindet. Von den Eigenschaften des Promotors (bzw. der Bereitschaft der RNA-Polymerase, an ihn zu binden) hängt es ab, mit welcher Intensität RNA-Kopien des Gens hergestellt werden, d.h. ob es „stark“ oder „schwach“ exprimiert wird.
Protoplastentransformation	Durch Einwirkung geeigneter Enzyme können pflanzliche Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und von ihrer Zellwand befreit werden. Übrig bleiben Protoplasten, die in isotonischen Medien stabil erhalten und kultiviert werden können. Eine durch Elektroporation oder Behandlung mit Polyethylenglycol erzeugte Destabilisierung macht die äußere Plasmamembran der Protoplasten passierbar für DNA-Moleküle, die in den Kern eindringen und in das Genom integrieren können.
Rekombinations- <i>hotspots</i>	für Rekombinationsereignisse anfällige DNA-Regionen.
<i>Repeats</i>	s. Sequenzwiederholung.
Retroelemente (Retrotransposons), (s.auch revers transkribierte Elemente)	Die bei Pflanzen verbreiteten Retrotransposons ähneln den tierischen Retroviren insofern, da sie ebenfalls in das Genom der Wirtszelle integrieren. Ihnen fehlt allerdings die genetische Information für eine weitere Ausbreitung. Pflanzengenome enthalten z.T. große Mengen an Retrotransposons, z.B. bestehen ca. 50% des Maisgenoms aus Retrotransposons.

Revers transkribierte Elemente	Als Revers transkribierte Elemente bezeichnet man Genome und Sequenz-Elemente, die das Enzym Reverse Transkriptase zur Replikation verwenden. Es gibt zwei Grundformen revers transkribierter Elemente: (a) Revers transkribierte Viren, die Gene für Produkte (Capsidproteine) besitzen, mit deren Hilfe sie neue Wirte befallen können, und (b) Retroelemente, die in das Genom integrieren können, jedoch keine Möglichkeit besitzen, andere Wirte zu infizieren. Die Gruppe der Viren teilt sich in (i) Retroviren (nur in Vertebraten), die RNA verpacken und deren Replikationszyklus eine Integration in des Wirtsgenom erfordert, und (ii) Para-Retroviren (nur in Pflanzen), die DNA verpacken und deren Replikation keine Integration ins Wirtsgenom vorsieht.
Sense-Suppression	s. Co-Suppression.
Sequenzrearrangements	Neuordnung einer Sequenzabfolge.
Sequenzwiederholungen	Wiederholungen von Nucleinsäure-Sequenzelementen mit einer Länge von wenigen Nucleotiden bis mehreren hundert Basen-paaren. Man unterscheidet direkte Sequenzwiederholungen, wenn sich das gleiche Sequenzelement in gleicher Leserichtung auf einem DNA-Strang befindet (direkte Sequenzwiederholungen in unmittelbarem Kontakt werden auch als Tandem-Repeats bezeichnet): <pre> 5' -GGCCTTA TTCCC GTTAG TTCCC TGTAA-3' 3' -CCGGAATAAGGGCAATCAAGGGACATT-5' </pre> indirekte Sequenzwiederholungen, wenn das gleiche Sequenzelement auf dem gleichen DNA-Strang einmal in 5'-3'-Richtung und einmal in 3'-5'-Richtung vorkommt: <pre> 5' -GGCCTTA TTCCC GTTAG CCCTT TGTAA-3' 3' -CCGGAATAAGGGCAATCGGGAAACATT-5' </pre> und invertierte Sequenzwiederholungen, wenn sich das gleiche Sequenzelement in gleicher Leserichtung auf beiden DNA-Strängen befindet: <pre> 5' -GGCCTTA TTCCC GTTAGGGGAAAGTAA-3' 3' -CCGGAATAAGGGCAATC CCCTT TCATT-5' </pre> Aus invertierten Sequenzwiederholungen können durch intramolekulare Ausbildung von Doppelstrangbereichen charakteristische Strukturen wie Haarnadel-Strukturen (<i>hairpin-loops</i> bei einzelsträngigen Nucleinsäure-Molekülen) und Cruciform-Strukturen (bei doppelsträngigen Molekülen) entstehen:

<i>Silencer Loci</i>	Transgene Loci, die durch ektopische Paarung oder durch die Produktion aberranter Transkripte andere, homologe Gene inaktivieren können.
Somaklonale Variation	Genetische und/oder epigenetische Veränderungen im Genom somatischer Zellen. Zum Tragen kommen solche Veränderungen, wenn aus somatischen Zellen (wie bei Pflanzen möglich) wieder intakte Organismen regeneriert werden. Eine der Ursachen für aberrante Wuchsformen regenerierter Pflanzen aus Gewebekulturen.
Terminator	Der hinter einem Gen (oder 3'- <i>downstream</i>) liegende Sequenzabschnitt, der von der RNA-Polymerase als Signal zum Abbruch der Transkription erkannt wird.
<i>Threshold-Modell</i>	Modell zum <i>gene silencing</i> , das davon ausgeht, dass Transkripte, deren Konzentration einen bestimmten Level übersteigen, durch RNasen degradiert werden.
Trans-Inaktivierung	Inaktivierung eines Gens durch den Einfluß von Sequenzelementen, Faktoren, Methylierungsmustern oder DNA-Tertiärstrukturen (Chromatin), die sich weiter entfernt vom Gen befinden, z.B. auf anderen Chromosomen.
<i>Transkriptionales gene silencing</i> (TGS)	Die Inhibierung der Expression eines Gens findet auf transkriptionaler Ebene statt. Die Transkription des Gens wird verhindert, eine Boten-RNA bzw. mRNA wird nicht gebildet.
Translokation	Austausch von Teilen zwischen zwei Chromosomen.
Transvektion	Ein der Paramutation entsprechender Prozess bei <i>Drosophila</i>
Transposon	In Pro- und Eukaryoten vorkommende Sequenzelemente, die die Fähigkeit besitzen, innerhalb des Genoms an unterschiedliche Stellen zu „springen“ und dort zu integrieren (bei Bakterien auch in Plasmide oder Phagengenome). Sie besitzen eine charakteristische Länge (ein oder mehrere Gene) und sind beiderseits begrenzt von kurzen, nicht-codierenden invertierten Sequenzwiederholungen.
vertikaler Gentransfer	Der Austausch genetischer Information zwischen kreuzungskompatiblen Individuen auf sexuellem Weg und Weitergabe der Information an die Nachkommen.
<i>Virus induced gene silencing</i> (VIGS)	Eine spezielle Variante des <i>homology dependent gene silencing</i> , bei der homologe Sequenzen durch Virusbefall in die Zelle gelangen und dort ein <i>silencing</i> dieser Sequenzen verursachen können. Viren enthalten i.d.R. keine pflanzlichen Gene, es lassen sich jedoch rekombinante Viren mit solchen Genen oder Pflanzen mit viralen Sequenzen herstellen. So enthalten z.B. viele inzwischen auch kommerziell angebaute, gentechnisch veränderte Pflanzen den 35S-Promoter des Blumenkohlmosaik-Virus als regulatorische Sequenz. In Freilandexperimenten wurde bereits nachgewiesen, dass ein Befall solcher Pflanzen mit dem Blumenkohlmosaik-Virus eine Inaktivierung von durch den 35S-Promotor kontrollierten Genen verursachen kann.

9 LITERATUR

- Al-Kaff NS, Kreike MM, Covey SN, Pitcher R, Page AM, Dale Philip J. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nature Biotechnology* 18, 995-999 (2000)
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13079-13084 (1998)
- Angenent GC, Franken J, Busscher M, Colombo L, van Tunen AJ. Petal and stamen formation in petunia is regulated by the homeotic gene *fbp1*. *Plant Journal* 4, 101-112 (1993)
- Arumuganathan K and Earle E. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter (ISPMB)* 9, 208-218 (1991)
- Assaad FF, Signer ER. Somatic and germinal recombination of a direct repeat in *Arabidopsis*. *Genetics* 132, 553-566 (1992)
- Assaad FF, Tucker KL, Signer ER. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 22, 1067-1085 (1993)
- Atkinson RG, Bielecki LRF, Gleave AP, Janssen BJ, Morris BAM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant Journal* 15, 593-604 (1998)
- Balandin T, Castresana C. Silencing of a beta-1,3-glucanase transgene is overcome during seed formation. *Plant Molecular Biology* 34, 125-137 (1997)
- Barak Z, Lindsley D, Gallant J. On the mechanism of leftward frameshifting at several hungry codons. *Journal of Molecular Biology* 256, 676-684 (1996)
- Barton KA, Whiteley HR, Yang N. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiology* 85, 1103-1109 (1987)
- Barton KA, Binns AN, Matzke AJ, Chilton MD. Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* 32, 1033-1043 (1983)
- Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 125-197 (1998)
- Baulcombe DC. Unwinding RNA silencing. *Science* 290, 1108-1109 (2000)
- Beclin C, Berthome R, Palauqui JC, Tepfer M, Vaucheret H. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing on nonviral (Trans)genes. *Virology* 252, 313-317 (1998)
- Bellen HJ, D'Evelyn D, Harvey M, Elledge SJ. Isolation of temperature-sensitive diphtheria toxins in yeast and their effects on *Drosophila* cells. *Development* 114, 787-796 (1992)
- Bellucci M, Alpini A, Paolocci F, Damiani F, Arcioni S. Transcription of a maize cDNA in *Lotus corniculatus* is regulated by T-DNA methylation and transgene copy number. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 257-264 (1999)
- Boerjan W, Bauw G, Van Montagu M, Inze D. Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* 6, 1401-1414 (1994)
- Brandle JE, McHugh SG, James L, Labbe H, Miki BL. Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *csrl-I* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Bio-Technology* 13, 994-998 (1995)
- Brignetti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO*

- Journal 17, 6739-6746 (1998)
- Brink RA. A Genetic change associated with the *R*-locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* 41, 872-889 (1956)
- Brusslan JA, Tobin EM. Isolation of new promoter-mediated co-suppressed lines in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27, 809-813 (1995)
- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE. Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 9, 925-945 (1997)
- Cervera M, Pina JA, Juarez J, Navarro L, Pena L. A broad exploration of a transgenic population of Citrus, stability of gene expression and phenotype. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 670-677 (2000)
- Chandler VL, Eggleston WB, Dorweiler JE. Paramutation in maize. *Plant Mol Biology* 43, 121-145 (2000)
- Cheng M, Fry JE, Pang, SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115, 971-980 (1997)
- Cherdshevasart W, Gharti-Chhetri GB, Saul MW, Jacobs M., Negrutiu I. Expression instability and genetic disorders in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. plants. *Transgenic Research* 2, 307-320 (1993)
- Chyi YS, Jorgensen RA, Goldstein D, Tanksley SD, Loaiza Figueroa F. Locations and stability of *Agrobacterium* mediated ti plasmid insertions in the *lycopersicon* genome. *Molecular and General Genetics* 204, 64-69 (1986)
- Cluster PD, O'Dell M, Metzloff M, Flavell RB. Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Molecular Biology* 32, 1197-1203 (1996)
- Comai L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* 43, 387-399 (2000)
- Conner AJ, Mlynarova L, Stiekema WJ, Nap JP. Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. *Molecular Breeding* 4, 47-58 (1998)
- Covey SN, Lomonossoff GP, Hull R. Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major polyadenylated transcripts. *Nucleic Acids Research* 9, 6735-6747 (1981)
- Covey SN, Al-Kaff NS. Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43, 307-322 (2000)
- Curtis IS, Power JB, Hedden P, Phillips A, Lowe KC., Ward DA, Davey MR. Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L. - Incidence of transgene silencing. *Annals of Botany* 86, 63-71, (2000)
- Czernilofsky AP, Hain R, Herrera Estrella L, Loez H, Goyvaerts E, Baker BJ, Schell J. Fate of selectable marker DNA integrated into the genome of *Nicotiana tabacum*. *DNA* 5, 101-114 (1986)
- Dale EC, Ow DW. Intramolecular and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91, 79-86 (1990)
- Damato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *Critical Reviews in Plant Sciences* 3, 73-112 (1985)
- De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M., Depicker A. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 6, 459-468 (2000)
- De Block M, Debrouwer D, Moens T. The development of a nuclear male sterility system in wheat - expression of the barnase gene under the control of tapetum specific

- promoters. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 125-131 (1997)
- De Carvalho F, Gheysen G, Kushnir S, Van Montagu M, Inze D, Castresana C. Suppression of beta-1,3 glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO Journal* 11, 2595-2602 (1992)
- De Carvalho-Niebel F, Frendo P, Van Montagu M, Cornelissen M. Post-Transcriptional Cosuppression of beta-1,3-Glucanase Genes Does Not Affect Accumulation of Transgene Nuclear mRNA. *Plant Cell* 7, 347-358 (1995)
- De Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase, a molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 172-176 (1994)
- De Neve M, De Buck S, De Wilde C, Van Houdt H, Strobbe I, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 260, 582-592 (1999)
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant Journal* 11, 15-29 (1997)
- De Rocher EJ, Harkins KR, Galbraith DW, Bohnert H. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science* 250, 99-101 (1990)
- De Rocher EJ, Vargogogola TC, Diehn SH, Green PJ. Direct evidence for rapid degradation of bacillus thuringiensis toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiology* 117, 1445-1461 (1998)
- Dehio C, Schell J. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5538-5542 (1994)
- Deroles SC, Gardner RC. Analysis of the T DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium mediated transformation. *Plant Molecular Biology* 11, 365-378 (1988a)
- Deroles SC, Gardner RC. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium mediated transformation. *Plant Molecular Biology* 11, 355-364 (1988b)
- Diehn SH, Chiu WL, Derocher EJ, Green PJ. Premature polyadenylation at multiple sites within a bacillus thuringiensis toxin gene-coding region. *Plant Physiology* 117, 1433-1443 (1998)
- Doerfler W. DNA methylation - a regulatory signal in eukaryotic gene expression. *Journal of General Virology* 57, 1-20 (1981)
- Dorlhac De Borne F, Vincentz M, Chupeau Y, Vaucheret H. Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* 243, 613-621 (1994)
- Dougherty WG, Parks TD. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Current Opinion in Cell Biol* 7, 399-405 (1995)
- Elmayan T, Balzergue S, Beon F, Bourdon V, Daubremet J, Guenet Y, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S, Vialle T, Wostrikoff K, Vaucheret H. Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 10, 1747-1757 (1998)
- Elmayan T, Vaucheret H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal* 9, 787-797 (1996)
- Elomaa P, Helariutta Y, Griesbach RJ, Kotilainen M, Seppanen P, Teeri TH. Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Molecular and General Genetics* 248, 649-656 (1995)
- English JJ, Mueller E, Baulcombe DC. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8, 179-188 (1996)

- English JJ, Jones JDG. Epigenetic instability and trans-silencing interactions associated with an SPT::Ac T-DNA locus in tobacco. *Genetics* 148, 457-469 (1998)
- Fagard M, Vaucheret H. (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 167-194 (2000a)
- Fagard M, Vaucheret H. Systemic silencing signal(s). *Plant Molecular Biology* 43, 285-293 (2000b)
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11650-11654 (2000)
- Fecker LE, Kaufmann A, Commandeur U, Commandeur J, Koenig R, Burgermeister W. Expression of single-chain antibody fragments (scfv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kda protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* 32, 979-986 (1996)
- Finnegan EJ, McElroy D. Transgene inactivation - plants fight back! *Bio-Technology* 12, 883-888 (1994)
- Finnegan EJ, Kovac KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 43, 189-201 (2000)
- Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* 15, 358-363 (1999)
- Fladung M. Transgenic potato plants can be used to evaluate stability of foreign genes - reversion and chimeras in multiple copies of rolC harboring clones. *Agronomie* 16, 113-121 (1996)
- Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*) I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Molecular and General Genetics* 260, 574-581 (1999)
- Fu X, Kohli A, Twyman RM, Christou P. Alternative silencing effects involve distinct types of non-spreading cytosine methylation at a three-gene, single-copy transgenic locus in rice. *Molecular and General Genetics* 263, 106-118 (2000)
- Fu X, Duc Le T, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9, 11-19 (2000)
- Furner IJ, Sheikh MA, Collett CE. Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*, Genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* 149, 651-662 (1998)
- Gaffe J, Tiznado ME, Handa AK. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiology* 114, 1547-1556 (1997)
- Gal S, Pisan B, Hohn T, Grimsley N, Hohn B. Genomic homologous recombination in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 10, 1571-1578 (1991)
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis-thaliana*. *Plant Physiology* 96, 985-989 (1991)
- Gelvin SB. The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in BioTechnology* 9, 227-232 (1998)
- Gheysen G, Angenon G, Van Montagu M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation, a scientifically intriguing story with significant applications. *Transgenic Plant Research*, 1-33 (1998)
- Gilissen LJW, Van Staveren MJ, Creemers-Molenaar J, Verhoeven HA. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. *Plant Science* 91, 171-179 (1993)
- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T. Induction of male sterility

- in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 6522-6527 (2001)
- Goldberg RB. Plants novel developmental processes. Science 240 (4858), 1460-1467 (1988)
- Goldman MHS, Goldberg RB, Mariani C. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. EMBO Journal 13, 2976-2984 (1994)
- Goossens A, Dillen W, De Clercq J, Van Montagu M, Angenon G. The arcelin-5 gene of *Phaseolus vulgaris* directs high seed-specific expression in transgenic *Phaseolus acutifolius* and *Arabidopsis* plants. Plant Physiology 120, 1095-1104 (1999)
- Goto S, Thakur RC, Ishii K. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. Plant Cell Reports 18, 193-197 (1998)
- Grant SR. Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing, Divide and conquer. Cell 96, 303-306 (1999)
- Grevelding C, Fantes V, Kemper E, Schell J, Masterson R. Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. Plant Molecular Biology 23, 847-860 (1993)
- Guo M, Davis D, Birchler JA. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. Genetics 142, 1349-1355 (1996)
- Hänisch ten Cate CH, Loonen AEHM, Ottaviani MP, Ennik L, Van Eldik G, Stiekema WJ. Frequent spontaneous deletions of ri T-DNA in *Agrobacterium-rhizogenes* transformed potato roots and regenerated plants. Plant Molecular Biology 14, 735-742 (1990)
- Haffani YZ, Overney S, Yelle S, Bellemare G, Belzile FJ. Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the *Bacillus thuringiensis* cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. Molecular and General Genetics 264, 82-88 (2000)
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small *Antisense* RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286, 950-952 (1999)
- Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutterson N. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. Plant Journal 19, 727-734 (1999)
- Hart CM, Fischer B, Neuhaus JM, Meins FJ. Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. Molecular and General Genetics 235, 179-188 (1992)
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 2122-2127 (1997)
- Heberle-Bors E, Charvat B, Thompson D, Schernthaner JP, Barta A, Matzke AJM, Matzke MA. Genetic analysis of T-DNA insertions into the tobacco genome. Plant Cell Reports 7, 571-574 (1988)
- Hepburn AG, Clarke LE, Pearson L, White J. The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor. Journal of Molecular und Applied Genetics 2, 315-29 (1983)
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant Journal 6, 271-282 (1994)
- Hohn B, Puchta H. Gene therapy in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 8321-8323 (1999)
- Hohn T, Corsten S, Rieke S, Muller M, Rothnie H. Methylation of coding region alone inhibits

- gene expression in plant protoplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 8334-8339 (1996)
- Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. Agrobacterium and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19, 15-38 (1992)
- Hovenkamp Hermelink JHM, Jacobsen E, Pijnacker LP, De Vries JN, Witholt B, Feenstra WJ. Cytological studies on adventitious shoots and minitubers of a monoploid potato clone. Euphytica 39, 213-220 (1988)
- Iannacone R, Grieco PD, Cellini F. Specific sequence modifications of a cry3b endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. Plant Molecular Biology 34, 485-496 (1997)
- Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJM. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. Plant Cell 9, 1251-1264 (1997)
- Immink RGH, Hannapel DJ, Ferrario S, Busscher M, Franken J, Campagne MML, Angenent GC. A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. Development 126, 5117-5126 (1999)
- Itoh K, Nakajima M, Shimamoto K. Silencing of waxy genes in rice containing Wx transgenes. Molecular and General Genetics 255, 351-358 (1997)
- Iyer LM, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC. Transgene silencing in monocots. Plant Molecular Biology 43, 323-346 (2000)
- Jack T. Plant development going MADS. Plant Molecular Biology 46, 515-520 (2001)
- Jacobs JMR, Litiere K, Van Dijk V, Van Eldik GJ, Van Montagu M, Cornelissen M. Post-transcriptional beta-1,3-glucanase gene silencing involves increased transcript turnover that is translation-independent. Plant Journal 12, 885-893 (1997)
- Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, Van Der Winden J, Matzke M, Matzke AJ. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. Plant Journal 17, 131-140 (1999)
- James DJ, Passey AJ, Baker SA, Wilson FM. Transgenes display stable patterns of expression in apple fruit and mendelian segregation in the progeny. Bio-Technology 14, 56-60 (1996)
- James R, Difazio SP, Brunner AM, Strauss SH. Environmental effects of genetically engineered woody biomass crops. Biomass und Bioenergy 14, 403-414 (1998)
- Jarvis P, Belzile F, Dean C. Inefficient and incorrect processing of the AC transposase transcript in *iae1* and wild-type *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 11, 921-931 (1997)
- Jones AL, Thomas CL, Maule AJ. De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. EMBO Journal 17, 6385-6393 (1998)
- Jones AL, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe David C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. Plant Cell 11, 2291-2301 (1999)
- Jongsma M, Korneef M, Zabel P, Hille J. Tomato protoplast DNA transformation: physical linkage and recombination of exogenous DNA sequences. Plant Molecular Biology 8, 383-394 (1987)
- Joos H, Inze D, Caplan A, Sormann M, Van Montagu M, Schell J. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. Cell 32, 1057-1067 (1983)
- Jorgensen RA. Beyond *Antisense* - how do transgenes interact with homologous plant genes. Trends in Biotechnology 9, 266-267 (1991)
- Jorgensen RA. Silencing of plant genes by homologous transgenes. AgBiotech News and Information 4, 265-273 (1992)

- Jorgensen RA. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* 268 (5211), 686-691 (1995)
- Jorgensen R, Snyder C, Jones JDG. T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium-tumefaciens* C58 derivatives. *Molecular and General Genetics* 207, 471-477 (1987)
- Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. 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 (1996)
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43, 179-188 (2000)
- Kang HG, Jeon JS, Lee S, An GH. Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. *Plant Molecular Biology* 38, 1021-1029 (1998)
- Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses, Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470 (1998)
- Kilby NJ, Leyser HM, Furner IJ. Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 20, 103-112 (1992)
- Kitashiba H, Kitazawa E, Kishitani S, Toriyama K. Partial male sterility in transgenic tobacco carrying an *Antisense* gene for alternative oxidase under the control of a tapetum-specific promoter. *Molecular Breeding* 5, 209-218 (1999)
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, Nguyen LV, Conkling MA, Thompson WF, Rtson D. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal* 14, 91-100 (1998)
- Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA, Christou P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant Journal* 17, 591-601 (1999)
- Köhne S, Neumann K, Puhler A, Broer I. The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. *Journal of Plant Physiology* 153, 631-642 (1998)
- Kokko HI, Karenlampi SO. Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 17, 822-826 (1998)
- Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T, Kubo T. Advances in cereal gene transfer. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 161-165 (1998)
- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB. Integration of T-DNA binary vector backbone sequences into the tobacco genome - evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal* 11, 945-957 (1997)
- Kovalchuk O, Arkhipov A, Barylyak I, Karachov I, Titov V, Hohn B, Kovalchuk I. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutation Research* 449, 47-56 (2000)
- Kozziel MG, Carozzi NB, Desai N. Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Molecular Biology* 32, 393-405 (1996)
- Kuipers GJ, Vreem JTM, Meyer H, Jacobsen E, Feenstra WJ, Visser RGF. Field evaluation of *Antisense* RNA mediated inhibition of GBSS gene expression in potato. *Euphytica* 59, 83-91 (1991)
- Kumagai MH, Donson J, Dellacioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1679-1683, (1995)
- Kumar S, Fladung M. Determination of transgene repeat formation and promoter methylation

- in transgenic plants. *Biotechniques* 28, 1128 (2000)
- Kumar S, Fladung M. Transgene repeats in aspen, molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Molecular and General Genetics* 264, 20-28 (2000)
- Kumar S, Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta*, in press (2001)
- Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Iyer LM, Li GF, Hall TC. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends in Plant Science* 3, 97-104 (1998)
- Kumpatla SP, Hall TC. Organizational complexity of a rice transgene locus susceptible to methylation-based silencing. *IUBMB Life* 48, 459-467 (1999)
- Kunz C, Schob HP, Stam M, Kooter JM, Meins F Jr. Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. *Plant Journal* 10, 437-450 (1996)
- Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in BioTechnology* 7, 489-493 (1996)
- Lebel EG, Masson J, Bogucki A, Paszkowski J. Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 422-426 (1993)
- Levy YY, Dean C. The transition to flowering. *Plant Cell* 10, 1973-1989 (1998)
- Lichtenauer-Kaligis EGR, Thijssen J, Dendulk H, Vandeputte P, Tasserondejong J, Giphartgassler M. Comparison of spontaneous hprt mutation spectra at the nucleotide sequence level in the endogenous hprt gene and five other genomic positions. *Mutation Research - Fundamental und Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 351, 147-155 (1996)
- Lindbo JA, Dougherty WG. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733 (1992)
- Luehrsen KR, Walbot V. Addition of A- and U-rich sequence increases the splicing efficiency of a deleted form of a maize intron. *Plant Molecular Biology* 24, 449-463 (1994)
- Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290(5494), 1151-1155 (2000)
- Malagnac F, Wendel B, Goyon C, Faugeron G, Zickler D, Rossignol JL, Noyerweidner M, Vollmayr P, Trautner TA, Walter J. A gene essential for de novo methylation and development in ascomycetes reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell* 91, 281-290 (1997)
- Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, Pruss GJ, Vance VB. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43, 295-306 (2000a)
- Marathe R, Smith TH, Anandalakshmi R, Bowman LH, Fagard M, Mourrain P, Vaucheret H, Vance VB. Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant Journal* 22, 51-59 (2000b)
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB. Induction of male sterility in plants by a chimeric rnaase gene. *Nature* 347 (6295), 737-741 (1990)
- Martinelli L, Mandolino G. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theoretical and Applied Genetics* 88, 621-628 (1994)
- Matassi G, Montero LM, Salinas J, Bernardi G. The isochore organization and the compositional distribution of homologous coding sequences in the nuclear genome of plants. *Nucleic Acids Research* 17, 5273-5290 (1989)

- Matzke AJM, Matzke MA. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 142-148 (1998a)
- Matzke AJM, Neuhuber F, Park YD, Ambros PF, Matzke MA. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants, Epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Molecular and General Genetics* 244, 219-229 (1994)
- Matzke MA, Matzke AJM. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *CMLS-Cell Mol. Life Sci.* 54, 94-103 (1998b)
- Matzke MA, Matzke AJM, Eggleston WB. Paramutation and transgene silencing - a common response to invasive DNA. *Trends in Plant Science* 1, 382-388 (1996)
- Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJM. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO Journal* 8, 643-650 (1989)
- Matzke MA, Neuhuber F, Matzke AJM. A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing. *Molecular and General Genetics* 238, 379-386 (1993)
- Matzke MA, Matzke AJM. How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes? *Plant Physiology* 107, 679-685 (1995)
- Matzke MA, Mette FM, Jakowitsch J, Kanno T, Moscone EA, van der Winden J, Matzke AJM. A test for transvection in plants: DNA-pairing may lead to trans-activation or silencing of complex heteroalleles in tobacco. *Genetics* 158, 451-461 (2001)
- McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AMM, Power JB, Davey MR. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 587-592 (1999)
- McElroy D, Brettell RIS. Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends in BioTechnology* 12, 62-68 (1994)
- Meilan R, Han KH, Ma CP, James RR, Eaton JA, Stanton BJ, Hoiem E, Crockett RP, Strauss SH. Development of glyphosate-tolerant hybrid cottonwoods. *TAPPI Journal* 83, 164-166 (2000)
- Meixner M, Schneider U, Schieder O, Pickardt T. Studies on the stability of foreign genes in the progeny of transgenic lines of *Vicia narbonensis*. *Current Plant Science und Biotechnology in Agriculture*. Terzi, M.; Cella, R.; Falavigna, A., Eds. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture; Current issues in plant molecular and cellular biology* 22, 285-290 (1995)
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5, 1661-1668 (1993)
- Merkle SA, Dean JFD. Forest tree biotechnology . *Current Opinion in BioTechnology* 11, 298-302 (2000)
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal* 19, 5194-5201 (2000)
- Mette MF, Matzke AJM, Matzke MA. Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Current Biology* 11, 1119-1123 (2001)
- Meyer P. Stabilities and instabilities in transgene expression. *Transgenic Plant Research*. 263-275 (1998)
- Meyer P. Transcriptional transgene silencing and chromatin components . *Plant Molecular Biology* 43, 221-234 (2000)
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H. A new petunia flower color generated by

- transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330 (6149) 677-678 (1987)
- Meyer P, Linn F, Heidmann I, Meyer H, Niedenhof I, Saedler H. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Molecular and General Genetics* 231, 345-352 (1992)
- Meyer P, Niedenhof I, ten Lohuis M. Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *EMBO J* 13, 2084-2088 (1994)
- Meyer P, Heidmann I. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA, An indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 243, 390-399 (1994)
- Meyer P. Variation of transgene expression in plants. *Euphytica* 85, 359-366 (1995)
- Meyer P, Saedler H. Homology-dependent gene silencing in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 23-48 (1996)
- Meza TJ, Kamfjord D, Hakelien AM, Evans I, Godager LH, Mandal A, Jakobsen KS, Aalen RB. The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research* 10, 53-67 (2001)
- Mittelsten-Scheid O, Jakovleva L, Afsar K, Maluszynska J, Paszkowski J. A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7114-7119 (1996)
- Mittelsten-Scheid O, Paszkowski J. Transcriptional gene silencing mutants. *Plant Molecular Biology* 43, 235-241 (2000)
- Mittelsten-Scheid O, Afsar K, Paszkowski J. Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 632-637 (1998)
- Mol JNM, Stuitje AR, van de Krol A. Genetic manipulation of floral pigmentation genes. *Plant Molecular Biology* 13, 287-294 (1989)
- Morino K, Olsen OA, Shimamoto K. Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *Plant Journal* 17, 275-285 (1999)
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. *Arabidopsis* sgs2 and sgs3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542 (2000)
- Müller AJ, Mendel RR, Schiemann J, Simoens C, Inze D. High meiotic stability of a foreign gene introduced into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular and General Genetics* 207, 171-175 (1987)
- Mullin TJ, Bertrand S. Environmental release of transgenic trees in Canada - potential benefits and assessment of biosafety. *Forestry Chronicle*. 74, 203-219 (1998)
- Murray EE, Rocheleau T, Eberle M, Stock C, Sekar V, Adang M. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Molecular Biology* 16, 1035-1050 (1991)
- Nagy A. Cre recombinase, The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109 (2000)
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-290 (1990)
- Neumann K, Droege-Laser W, Köhne S, Broer I. Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology* 115, 939-947 (1997)

- Nilsson O, Wu E, Wolfe DS, Weigel D. Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Journal* 15, 799-804 (1998)
- Ottaviani MP, Ten Cate CHH, Van Vloten Doting L. Expression of introduced genes after tuber propagation of transgenic potato plants. *Plant Breeding* 9, 89-96 (1992)
- Otten L, De Greve H, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schieder O, Straub J, Schell J. Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* 183, 209-213 (1981)
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H. Systemic acquired silencing, Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal* 16, 4738-4745 (1997)
- Palauqui JC, Vaucheret H. Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression, A comparative study of 38 combinations of transgene loci. *Plant Molecular Biology* 29, 149-159 (1995)
- Palauqui JC, Elmayan T, Dorlhac De Borne F, Crete P, Charles C, Vaucheret H. Frequencies, timing, and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 112, 1447-1456 (1996)
- Pang SZ, Jan FJ, Carney K, Stout J, Tricoli DM, Quemada HD, Gonsalves D. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant Journal* 9, 899-909 (1996)
- Pappenheimer AMJr. Diphtheria toxin. *Annual Review of Biochemistry* 46, 69-94 (1977)
- Park YD, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJM, Matzke MA. 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 (1996)
- Paszkowski J, Whitham SA. Gene silencing and DNA methylation processes. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 123-129 (2001)
- Pawlowski WP, Somers DA. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular BioTechnology* 6, 17-30 (1996)
- Peach C, Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology* 17, 49-60 (1991)
- Peerbolte R, Ruigrok P, Wullems G, Schilperoort R. T-DNA rearrangements due to tissue culture somaclonal variation in crown gall tissues. *Plant Molecular Biology* 9, 51-58 (1987)
- Pena L, Martin-Trillo M, Juarez J, Pina JA, Navarro L, Martinez-Zapater JM. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology* 19, 263-267 (2001)
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3324-3328 (1991)
- Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D. Genetically improved potatoes, protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology* 22, 313-321 (1993)
- Peterhans A, Schlupmann H, Basse C, Paszkowski J. Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO Journal* 9, 3437-3445 (1990)
- Pidkowich MS, Klenz JE, Haughn GW. The making of a flower, control of floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4, 64-70 (1999)

- Plegt L, Bino RJ. Beta glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 216, 321-327 (1989)
- Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C, Lifschitz E. The TM5 MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell* 6, 175-186 (1994)
- Pnueli L, Hareven D, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lifschitz E. Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* 6, 163-173 (1994)
- Potrykus I, Paszkowski J, Saul MW, Petruska J, Shillito RD. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Molecular and General Genetics* 199, 169-177 (1985)
- Pröls F, Meyer P. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant Journal* 2, 465-475 (1992)
- Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Vance VB. Plant viral synergism - the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859-868 (1997)
- Puchta H, Swoboda P, Gal S, Blot M, Hohn B. Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Molecular Biology* 28, 281-292 (1995a)
- Puchta H, Swoboda P, Hohn B. Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant Journal* 7, 203-210 (1995b)
- Pwee KH, Gray JC. The pea plastocyanin promoter directs cell-specific but not full light-regulated expression in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 3, 437-449 (1993)
- Qin XF, Holuigue L, Horvath DM, Chua NH. Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *The Plant Cell* 6, 863-874 (1994)
- Que Q, Wang HY, English JJ, Jorgensen RA. The frequency and degree of cosuppression by *Sense* chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature non*Sense* codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9 1357-1368 (1997)
- Ramanathan V, Veluthambi K. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* ti plasmid ptia6 from the left terminus of t-l-DNA. *Plant Molecular Biology* 28, 1149-1154 (1995)
- Register JC, Peterson DJ, Bell PJ, Bullock WP, Evans IJ, Frame B, Greenland J, Higgs NS, Jepson I, Jiao S, Lewnau CJ, Sillick JM,, Wilson HM. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Molecular Biology* 25, 951-961 (1994)
- Renckens S, De Greve H, Van Montagu M, Hernalsteens JP. *Petunia* plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. *Molecular and General Genetics* 233, 53-64 (1992)
- Reynaerts A, Van De Wiele H, De Sutter G, Janssens J. Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production. *Scientia Horticulturae* 55, 125-139 (1993)
- Ries G, Heller W, Puchta H, Sandermann H, Seidlitz HK, Hohn B. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406(6791), 98-101 (2000)
- Risseuw E, Frankevandijk MEI, Hooykaas PJJ. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *Plant Journal* 11, 717-728 (1997)
- Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nature Rev* 1, 11-19 (2000)

- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA, Brunner AM, Skinner JS, Ma CP, Cheng SP, Jouanin L, Pilate G, Strauss SH. Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant Journal* 22, 235-245 (2000)
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 937-946 (1998)
- Salinas J, Matassi G, Montero LM, Bernardi G. Compositional compartmentalization and compositional patterns in the nuclear genomes of plants. *Nucleic Acids Research* 16, 4269-4285 (1988)
- Schmidt-Bleek K, Grohmann L, Brennicke A. Reduction of mRNA levels for the 28.5 kDa iron-sulfur core protein of mitochondrial complex I inhibits pollen maturation in transgenic tobacco. *Plant Biology* 1, 198-206 (1999)
- Schmuelling T, Roehrig H, Pilz S, Walden R, Schell J. Restoration of fertility by *Antisense* RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. *Molecular and General Genetics* 237, 385-394 (1993)
- Schmulling T, Rohrig H. Gene silencing in transgenic tobacco hybrids - frequency of the event and visualization of somatic inactivation pattern. *Molecular and General Genetics* 249, 375-390 (1995)
- Schwarz Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum-majus*. *Science* 250 (4983), 931-936 (1990)
- Scorza R, Levy L, Damsteegt V, Callahan A, Webb K, Ravelonandro M. Transfer of plum pox virus coat protein genes from a plum pox-resistant transgenic cline of *Prunus domestica* plum to its progeny through hybridization. *Hortscience* 33, 531 (1998)
- Selker EU. Gene silencing, Repeats that count. *Cell* 97, 157-160 (1999)
- Seyffert W. Lehrbuch der Genetik (Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KH, Eds.), Gustav Fischer/Stuttgart, Kapitel 19, „Erweiterung der Mendelschen Genetik“ (1998)
- Shalev G, Sitrit Y, Avivi-Ragolski N, Lichtenstein C, Levy AA. Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase RuvC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7398-7402 (1999)
- Sijen T, Kooter JM. Post-transcriptional gene silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520-531 (2000)
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JNM, Kooter JM. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* 11, 436-440 (2001)
- Smith CJ, Watson CF, Morris PC, Bird CR, Seymour GB, Gray JE, Arnold C, Tucker GA, Schuch W, Harding S. Inheritance and effect on ripening of *Antisense* polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology* 14, 369-379 (1990)
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Gilissen LJW. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* 97, 53-60 (1994)
- Soltis DE, Soltis PS. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12, 243-273 (1993)
- Spencer TM, O'Brien JV, Start WG, Adams TR, Gordon Kamm WJ, Lemaux PG. Segregation of transgenes in maize. *Plant Molecular Biology* 18, 201-210 (1992)
- Srivastava V, Anderson OD, Ow DW. Single-copy transgenic wheat generated through the

- resolution of complex integration patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 11117-11121, (1999)
- Srivastava V, Ow DW. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. Plant Molecular Biology 46, 561-566 (2001)
- Srivastava V, Vasil V, Vasil IK. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L). Theoretical and Applied Genetics 92, 1031-1037 (1996)
- Stam M, De Bruin, R, Kenter S, Van Der Hoorn RAL, Van Blokland R, Mol Joseph NM and Kooter JanM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. Plant Journal 12, 63-82 (1997a)
- Stam M, Mol JNM, Kooter JM. The silence of genes in transgenic plants. Annals of Botany 79, 3-12 (1997b)
- Strauss S, Boerjan W, Cairney J, Campbell M, Dean J, Ellis D, Jouanin L, Sundberg B. Forest biotechnology makes its position known. Nature Biotechnology 17, 1145 (1999)
- Strauss SH, Rotmann WH, Brunner AM, Sheppard LA. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. Molecular Breeding 1, 5-26 (1995)
- Sukhapinda K, Spivey R, Simpson RB, Shahin EA. Transgenic tomato *Lycopersicon-esculentum* L. Transformed with a binary vector in *Agrobacterium-rhizogenes* non-chimeric origin of callus clone and low copy numbers of integrated vector T-DNA. Molecular and General Genetics 206, 491-497 (1987)
- Swoboda P, Gal S, Hohn B, Puchta H. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. EMBO Journal 13, 484-489 (1994)
- Ten Lohuis M, Muller A, Heidmann I, Niedenhof I, Meyer P. A repetitive DNA fragment carrying a hot spot for de novo DNA methylation enhances expression variegation in tobacco and *petunia*. Plant Journal 8, 919-932 (1995)
- Thorsness MK, Kandasamy MK, Nasrallah ME, Nasrallah JB. Genetic ablation of floral cells in *Arabidopsis*. Plant Cell 5, 253-261 (1993)
- Tingay S, Mcelroy D, Kalla R, Fieg S, Wang MB, Thornton S, Brettell R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. Plant Journal 11, 1369-1376 (1997)
- Tsuchiya T, Toriyama K, Yoshikawa M, Ejiri SI, Hinata K. Tapetum-specific expression of the gene for an endo-beta-1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco. Plant and Cell Physiology 36, 487-494 (1995)
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Phillip A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes und Development 13, 3191-3197 (1999)
- Ulian EC, Magill JM, Magill CW, Smith RH. DNA methylation and expression of *NPT II* in transgenic *petunias* and progeny. Theoretical and Applied Genetics 92, 976-981 (1996)
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328 (6125), 33-37 (1987)
- van Aarssen R, Soetaert P, Stam M, Dockx J, Gossele V, Seurinck J, Reynaerts A, Cornelissen M. Cry IA(b) transcript formation in tobacco is inefficient. Plant Molecular Biology 28, 513-524 (1995)
- Van der Graaff E, Dendulkas A, Hooykaas PJJ. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. Plant Molecular Biology 31, 677-681 (1996)
- Van der Krol A, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR. Flavonoid genes in *petunia* addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2, 291-300 (1990)

- Van der Krol AR, Mol JNM, Stuitje AR. *Antisense* genes in plants an overview. EMBO/INSERM-Workshop on regulation of gene expression by RNA structure and anti-messengers. *Gene* 72, 45-50 (1988)
- Van der Meer IM, Stam ME, van Tunen AJ, Mol JN, Stuitje AR. *Antisense* inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4, 253-262 (1992)
- Van Houdt H, van Ingelbrecht V, Van Montagu M, Depicker A. Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *Plant Journal* 12, 379-392 (1997)
- Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM. 5'-proximal potyviral sequences mediate potato virus x potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590 (1995)
- Vaucheret H. Identification of a general silencer for 19S and 35S promoters in a transgenic tobacco plant, 90 bp of homology in the promoter sequence are sufficient for trans-inactivation. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie.* 316, 1471-1483 (1993)
- Vaucheret H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics* 17, 29-35 (2001)
- Vaucheret H, Palauqui JC, Elmayan T, Moffatt B. Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* 248, 311-317 (1995)
- Vergunst AC, Hooykaas PJJ. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 1-31 (1999)
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing, A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14147-14152 (1999)
- Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch HJ, Liao YC, Kreuzaler F, Fischer R. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Molecular Breeding* 1, 39-50 (1995)
- Walbot V, Cullis C. Rapid genomic change in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 367-396 (1985)
- Walter C, Broer I, Hillemann D, Puhler A. High frequency, heat treatment-induced inactivation of the phosphinothricin resistance gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Molecular and General Genetics* 235, 189-196 (1992)
- Wang MB, Waterhouse PM. High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* 43, 67-82 (2000)
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang MB. Virus resistance and gene silencing: Killing the messenger. *Trends in Plant Science* 4, 452-457 (1999)
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM. Leafy controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843-859 (1992)
- Wenck A, Czako M, Kanevski I, Marton L. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* 34, 913-922 (1997)
- Wilson HD, Barber SC, Walters T. Loss of duplicate gene expression in tetraploid *Chenopodium quinoa*. *Biochemical Systematics und Ecology* 11, 7-14 (1983)
- Wolfe KH, Sharp PM, Li WH. Mutation rates differ among regions of the mammalian genome. *Nature* 337 (6204), 283-285 (1989)

- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics, Regulation through repression. *Science* 286 (5439), 481-486 (1999)
- Wolters AMA, Visser RGF. Gene silencing in potato, Allelic differences and effect of ploidy. *Plant Molecular Biology* 43, 377-386 (2000)
- Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4, 759-771 (1992)
- Wullems GJ, Molendijk L, Ooms G, Schilperoort RA. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from in vitro induced opine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24, 719-727 (1981)
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19, 639-646 (2000)
- Ylstra B, Touraev A, Moreno RMB, Stoger E, Van Tunen AJ, Vicente O, Mol JNM, Heberle-Bors E. Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiology* 100, 902-907 (1992)
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* 13, 335-340 (1997)
- Zhong GY, Peterson D, Delaney DE, Bailey M, Witcher DR, Register IJC, Bond D, Li CP, Marshall L, Kulisek E, Ritland D, Meyer T, Hood EE, Howard JA. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding* 5, 345-356 (1999)
- Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczyński CL. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature BioTechnology* 18, 555-558 (2000)
- Zoglauer K, Aurich C, Kowarik I, Schepker I. Freisetzung transgener Gehölze und Grundlagen für Confinements. Umweltbundesamt Berlin, Forschungsbericht 29789033, UBA-FB 000054, Texte 31/00, (2000)
- Zupan JR, Zambryski P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107, 1041-1047 (1995)

10 ANHANG**10.1 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVEREICHNIS**

Tabellen	Seite
Tabelle 1: Untersuchungen, in denen die Expressions-Instabilität u.a. auf den Einbau von <i>backbone</i> -Sequenzen des Transformationsvektors zurückgeführt wird	32
Tabelle 2: Zunahme des <i>silencing</i> -Effektes nach Wechsel in den homozygoten Zustand	39
Tabelle 3: Transgen-Instabilität durch Sequenzveränderungen und/oder Deletionen	41
Tabelle 4: Entwicklungsspezifische Einflüsse auf die Expressionsstabilität	55-56
Tabelle 5: Einfluss abiotischer Faktoren auf die Expressionsstabilität	60-62
Tabelle 6: Publikationen zur Transformation von Gehölzpflanzen seit 1985, numerische Übersicht zu anwendungsorientierten Arbeiten	70
Tabelle 7: Ansätze zur Erzeugung steriler Linien durch (i) Expression cytotoxischer Enzyme in Blütenorganen und (ii) Suppression pflanzeigener, blütenspezifischer Gene	76-77
Tabelle 8: Liste der bei der Recherche zur Gehölztransformation berücksichtigten Gattungbezeichnungen	117
Abbildungen	Seite
Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Vorgänge bei der Realisierung der genetischen Information.	9
Abbildung 2: Ursachen und Faktoren, die die Stabilität transgener Merkmale beeinflussen können.	13
Abbildung 3: Verschiedene Aspekte bzw. Faktoren (kursiv), die mit der (In)Stabilität transgener Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen in Zusammenhang stehen und in dieser Dokumentation berücksichtigt bzw. diskutiert werden.	20
Abbildung 4: Beobachtete Formen der durch epigenetisches <i>gene silencing</i> oder noch unbekannte Regulationsmechanismen hervorgerufene Transgen-Instabilität im Verlauf der Herstellung und Aufzucht transgener Pflanzen.	22
Abbildung 5: Struktur eines transgenen Locus in Reis (aus Morino <i>et al.</i> 1999) mit Sequenzumlagerungen.	25
Abbildung 6: Eigenschaften der flankierenden, genomischen Sequenzbereiche, die die Expressions-stabilität eines Transgens epigenetisch beeinflussen können.	26
Abbildung 7: <i>Threshold</i> -Modell zur Induktion eines posttranskriptionalen <i>gene silencing</i> (RdRP=RNA-abhängige RNA-Polymerase).	35
Abbildung 8: Modell zum <i>gene silencing</i> , induziert durch selbst-komplementäre Transkripte nach Transkription invertierter Wiederholungen codierender Sequenzen (A) und Promotor-Sequenzen (B).	36
Abbildung 9: Modell zum <i>gene silencing</i> , induziert durch ektopische Paarung homologer Sequenzen, die sich am gleichen Locus oder an verschiedenen Loci befinden.	37

10.2 QUELLEN UND LITERATURRECHERCHE

Die Grundlage für diese Studie bilden Literaturrecherchen über die Datenbanken Current Contents (alle Bereiche, 1995 – August 2001), BIOSIS (1985 – Juli 2001), Agricola (1979 – Juni 2001) und Medline (1966 – Juli 2001). Die Grundrecherche zur **Transgen-Stabilität** erfolgte über verschiedene Kombinationen der Stichworte:

35S, Agrobacterium, backbone, binary vector, chromatin, ectopic, gene silencing, gene stability, genetic stability, homologous recombination, intrachromosomal recombination, isochore, methylation, mutation, rbcS, RNAi, silencing, stability, transgenic, unstable, utr, vector, virus resistance.

Die aus dieser Grundrecherche hervorgegangenen etwa 7500 Literaturstellen wurden inklusive Abstracts in Procite-Datenbanken übertragen und mit Hilfe geeigneter Keywords (mammalian, rats, human, cancer u.a.) wieder reduziert. Aus den verbleibenden ca. 1200 Veröffentlichungen wurden anhand der Zusammenfassungen und durch Stichwortsuche etwa 150 Publikationen ausgewählt, die die primäre Grundlage für diese Dokumentation darstellen. Hinzu kamen noch ca. 100 Veröffentlichungen, die in entsprechenden *key-papers* zitiert wurden.

Die Recherche zur **Transformation und Transgen-Stabilität bei Gehölzpflanzen** erfolgte durch Kombinationen der Stichworte *Agrobacterium, biolistic, microprojectile, particle gun, rhizogenes, transform*, transgenic, tumefaciens* mit den Begriffen *alder, apple, ash, aspen, birch, cedar, cherry, chesnut, conifer, fig, fir, hackberry, maple, myrtle, oak, palm, pear, pine, poplar, redbud, tree, woody*, sowie mit 156 in der folgenden Tabelle aufgelisteten Gattungsbezeichnungen.

Die Zusammenstellung basiert auf der „Arboretum Woody Plants List“ (S. Mary Grace Burns Arboretum of Georgian Court College - <http://gcconline.georgian.edu/taxonomy/>) und der „List of woody plants“ (Denison University Biological Reserve - <http://webby.cc.denison.edu/biology/bioreserve/tree.shtml>).

Tabelle 8: Liste der bei der Recherche zur Gehölztransformation berücksichtigten Gattungsbezeichnungen

Abies	Cinnamomum	Liriodendron	Sequoia
Acacia	Citrus	Liquidambar	Sequoiadendron
Acer	Cornus Cupressus	Lithocarpus	Spiraea
Acrocarpus	Corylus	Lyonathamnus	Smilax
Aesculus	Crataegus	Macadamia	Sophora
Agonis	Crinodendron	Magnolia	Stenocarpus
Albizia	Cryptocarya	Malus	Syzigium
Alnus	Crytomeria	Maytenus	Tabebuia
Angophora	Cupaniopsis	Melaleuca	Taxodium
Aralia	Cupressus	Melia	Taxus
Araucaria	Diospyros	Metasequoia	Thevetia
Arbutus	Elaeagnus	Metrosideros	Tilia
Archontophoenix	Eriobotrya	Morus	Tipuana
Arecastrum	Erythrina	Myoporum	Toxicodendron
Aristolochia	Eucaluptus	Nerium	Trachycarpus
Bauhinia	Fagus	Nyssa	Tristania
Betula	Ficus	Olea	Tsuga
Bischofia	Firmiana	Olmediella	Ulmus
Brachychiton	Fraxinus	Ostrya	Umbellularia
Brahea	Gaylussacia	Oxydendrum	Viburnum
Broussonetia	Geijera	Parthenocissus	Vaccinium
Butia	Ginkgo	Phoenix	Vitis
Callistemon	Gleditsia	Photinia	Washingtonia
Calocedrus	Hakea	Photinia	Zelkova
Calodendrum	Hamamelis	Pinus	
Carica	Harpephyllum	Pistacia	
Carya	Hevea	Pittosporum	
Cassia	Hydrangea	Platanus	
Castanea	Hymenosporum	Podocarpus	
Castanospermum	Ilex	Populus	
Casuarina	Jacaranda	Prosopis	
Catalpa	Jubaea	Prunus	
Cedrela	Juglans	Pyrus	
Cedrus	Juniperus	Quercus	
Celtis	Kalmia	Quillaja	
Ceratonia	Koelreuteria	Rhododendron	
Cercis	Lagerstroemia	Rhus	
Chilopsis	Laurus	Robina	
Chionanthus	Lagunaria	Rosa	
Chitalpa	Ligustrum	Rubus	
Chorisia	Lindera	Salix	

10.3 INTERNETADRESSEN

Allgemein zu Freisetzen und Kommerzialisierung transgener Pflanzen:

OECD-BioTrack

<http://www1.oecd.org/ehs/service.htm>

Information Systems for Biotechnology

<http://www.isb.vt.edu/>

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications

<http://www.isaaa.org/>

AgBios-Essential Biosafety

<http://www.essentialbiosafety.info/main.php>

Transgene Bäume:

Biotechnolgy at the Canadian Forest Service

http://www.nrcan-rncan.gc.ca/cfs-scf/science/resrch/biotechnology_e.html

Epigenetische Regulationsmechanismen

DNA Methylation Society

<http://dnamethsoc.server101.com/>

University of Virginia, Chromatin and Gene Expression Group

<http://www.cstone.net/~jrb7q/chrom.html>

Epigenetik, Arbeitsgruppe des Forschungsschwerpunkts "Krebsentstehung und Differenzierung"

<http://www.dkfz-heidelberg.de/epigenetik/default.htm>

MPIZ-Aktuell, Die lachsrote Petunie

<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~rsaedler/MPIZaktuell/Petunie/Petunie.html>

Internationaler Sortenschutz

The International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)

<http://www.upov.int/eng/index.htm>

10.4 LITERATUR ZU TABELLE 6, TRANSFORMATION VON GEHÖLZPFLANZEN - ANWENDUNGSORIENTIERTE STUDIEN

Virusresistenz

- Chen G, Ye CM, Huang JC, Yu M, Li BJ. Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Reports* 20, 272-277 (2001)
- Cheng Y-H, Yang J-S, Yeh S-D. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Reports* 16, 127-132 (1996)
- Chiang C-H, Jan F-J, Yeh S-D, Gonsalves D. Potential risk of papaya ringspot recombinant viruses with coat protein segments expressed in transgenic papaya. *Phytopathology* 90, S14 (2000)
- Chiang C-H, Wang J-J, Jan F-J, Yeh S-D, Gonsalves D. Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *Journal of General Virology* 82, 2827-2836 (2001)
- Da Camara Machado A, Katinger H, Laimer Da Camara Machado M. Coat protein-mediated protection against plum pox virus in herbaceous model plants and transformation of apricot and plum. *Euphytica* 77, 129-134 (1994)
- Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Pena L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19, 427-433 (2000)
- Escalettes V, Dahuron F, Ravelonandro M, Dosba F. Use of transgenic techniques to obtain plum and apricot clones expressing the coat-protein gene of plum pox potyvirus. *Bulletin Oepp (Organisation Europeenne et Mediterraneenne Pour la Protection des Plantes)* 24, 705-711 (1994)
- Ferreira SA, Pitz KY, Manshardt R, Zee F, Fitch M, Gonsalves D. Transgenic papaya controls papaya ringspot virus in Hawaii. *Phytopathology* 87, S30 (1997)
- Fitch M, Moore P, Leong, T, Gonsalves D. Transgenic papayas to the field: New cultivars and new propagation methods. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. 34, 47A (1998)
- Gaskill DA, Gonsalves D, Pitz KY, Seifried SE, Ferreira SA. Analysis of Papaya ringspot virus coat protein expression in transgenic papaya. *Phytopathology* 90, S27 (2000)
- Gaskill DA, Ferreira SA, Pitz KY, Gonsalves D. Age dependent resistance to papaya ringspot virus in hemizygous transgenic papaya. *Phytopathology* 88, S31 (1998)
- Ghorbel R, Dominguez A, Navarro L, Pena L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology* 20, 1183-1189 (2000).
- Golles R, Machado A Da Camara, Tsolova V, Bouquet A, Moser R, Lopes MS, Mendonca D, Katinger H, Machado M Laimer Da Camara. Transformation of somatic embryos of *Vitis* sp. (grapevine) with different constructs containing nucleotide sequences from nepovirus coat protein genes. *Arquipelago Boletim Da Universidade Dos Acores Ciencias Biologicas e Marinhas* 0, 67-74 (1996)
- Gonsalves C, Cai W, Tennant P, Gonsalves D. Efficient production of virus resistant transgenic papaya plants containing the untranslatable coat protein gene of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 87, S34 (1997)
- Gonsalves D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review of Phytopathology* 36, 415-437(1998)

- Gutierrez-E A, Moore GA, Jacono C, McCaffery M, Cline K. Production of transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus coat protein gene. *Phytopathology* 82, 1148 (1992)
- Gutierrez-E M, Luth D, Moore GA. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16, 745-753 (1997)
- Krastanova S, Perrin M, Barbier P, Demangeat G, Cornuet P, Bardonnet N, Otten L, Pinck L, Walter B. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports* 14, 550-554 (1995)
- Laimer Da Camara Machado M, Da Camara Machado A, Hanzer V, Weiss H, Regner F, Steinkellner H, Mattanovich D, Plail R, Knapp E, Et Al. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of plum pox virus. *Plant Cell Reports* 11, 25-29 (1992)
- Le Gall O, Torregrosa L, Danglot Y, Candresse T, Bouquet A. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Science* 102, 161-170 (1994)
- Lius S, Manshardt R, Gonsalves D, Fitch M, Slightom J, Sanford J. Field test of virus resistance in transgenic papayas. *Hortscience* 29, 483 (1994).
- Lius S, Manshardt RM, Fitch MMM, Slightom JL, Sanford JC, Gonsalves D. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Molecular Breeding* 3, 161-168 (1997)
- Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M, Scorza R. Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenic plum by chip bud inoculation of plum pox virus PPV-S. *Acta Virologica* 42, 241-243 (1998)
- Manshardt R, Lius S, Gonsalves D, Fitch M, Slightom J, Sanford J. Stability of PRV resistance in transgenic papaya. *Hortscience* 30, 904 (1995)
- Manshardt R, Gonsalves D. Mechanism and stability of virus resistance in transgenic papaya. *Hortscience*. 34, 557 (1999)
- Mauro MC, Toutain S, Walter B, Pinck L, Otten L, Coutos-Thevenot P, Deloire A, Barbier P. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* 112, 97-106 (1995)
- Palacios-Torres EC, Gutierrez-Espinosa MA, Moore GA, Mora-Aguilera G, Ochoa-Martinez DL, Villegas-Monter A. Genetic transformation of grapefruit (*Citrus paradisi*) and sweet orange (*C. sinensis*) with the coat protein gene of CTV. *Hortscience* 35, 402 (2000)
- Ravelonandro M, Scorza R, Dunez J. Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene. *Acta Virologica* 42, 270-272 (1998)
- Ravelonandro M, Scorza R, Bachelier JC, Labonne G, Levy L, Damsteegt V, Callahan AM, Dunez J. Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Disease* 81, 1231-1235 (1997)
- Ravelonandro M, Scorza R, Callahan A, Cordts J, Monsion M, Fuchs M, Delbos R, Bachelier J, Gonsalves D, Dunez J. Production of plants of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica* transgenic for plum pox potyvirus coat protein, and demonstration of PPV resistance in transformed *N. benthamiana*. *Bulletin Oepp (Organisation Europeenne et Mediterranee Pour la Protection des Plantes)* 24, 713-719 (1994)
- Ravelonandro M, Scorza R, Callahan A, Levy L, Jacquet C, Monsion M, Damsteegt V. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: The plum pox (sharka) model. *Virus Research* 71, 63-69 (2000)
- Schell JL, Pappu HR, Pappu SS, Derrick KS, Lee RF, Niblett CL, Grosser JW. Transformation

- of 'Nova' tangelo with the coat protein gene of citrus tristeza closterovirus. *Phytopathology* 84, 1076 (1994)
- Scorza R, Cordts JM, Mante S, Gonsalves D, Damsteegt VD, Slightom JL. Agrobacterium mediated transformation of plum *Prunus domestica* L. with the papaya ringspot virus coat protein gene. *Hortscience* 26, 786 (1991)
- Scorza R, Cordts JM, Mante S, Gonsalves D, Damsteegt VD, Yepes LM, Slightom JL. Agrobacterium mediated transformation of plum *Prunus domestica* L. with the coat protein gene of papaya ringspot virus. keystone symposium on crop improvement via biotechnology: an international perspective. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 16, 211 (1992)
- Scorza R, Cordts JM, Gray DJ, Gonsalves D, Emershad RL, Ramming DW. Producing transgenic 'Thompson Seedless' grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121, 616-619 (1996)
- Scorza R, Levy L, Damsteegt V, Callahan AM, Ravelonandro M. Pyramiding of coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce plum pox resistance in plums. *Phytopathology* 87, S87 (1997)
- Scorza R, Levy L, Damsteegt V, Callahan AM, Ravelonandro M. Resistance in transgenic plum to plum pox virus infection. *Phytopathology* 86 S57 (1996)
- Scorza R, Levy L, Damsteegt V, Yepes M, Cordts J, Haddidi A, Slightom J, Gonsalves D, Callahan A, Ravelonandro M. Transformation of plum (*Prunus domestica* L.) with potyvirus coat protein genes and the reaction of transgenic plants to inoculation with plum pox virus. *Hortscience* 28 152-153 (1993)
- Scorza R, Callhan A, Levy L, Webb K, Damsteegt V, Ravelonandro M. Producing virus resistant *Prunus* through coat protein mediated cross protection. *Phytopathology* 88, S131-S132 (1998)
- Scorza R, Levy L, Damsteegt V, Callahan A, Webb K, Ravelonandro M. Transfer of plum pox virus coat protein genes from a plum pox-resistant transgenic cline of *Prunus domestica* plum to its progeny through hybridization. *Hortscience* 33, 531 (1998)
- Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J, Gonsalves D. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Reports* 14, 18-22 (1994)
- Souza MTJr, Gonsalves D. Development of transgenic *Carica papaya* L. resistant to the Brazilian isolate of PRSV: A case of technology transfer between Cornell University and EMBRAPA. *Phytopathology* 88, S137 (1998)
- Souza MTJr, Tennant P, Gonsalves D. Number of coat protein (cp) inserts, gene dosage, and cp sequence affect resistance of transgenic papaya to papaya ringspot virus (PRSV). *Phytopathology* 88, S84 (1998)
- Spielmann A, Krastanova S, Douet-Orhant V, Gugerli P. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene. *Plant Science* 156, 235-244 (2000)
- Tennant P, Fitch M, Manshardt R, Slightom J, Gonsalves D. Analysis of papaya ringspot virus isolates differing in pathogenicity on transgenic papaya. *Phytopathology* 85, 1145 (1995)
- Tennant P, Fitch M, Manshardt R, Slightom J, Gonsalves D. Resistant against papaya ringspot virus isolates in coat protein transgenic papaya is affected by transgene dosage and plant development. *Phytopathology* 87, S96 (1997)
- Tennant P, Gonsalves C, Ling K, Fitch M, Manshardt R, Slightom J, Gonsalves D. Transgenic and classically cross protected papaya show limited protection against papaya ringspot virus isolates from different geographical regions. *Phytopathology* 84, 1375 (1994)
- Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, Gonsalves D.

- Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84, 1359-1366 (1994)
- Tennant P, Fermin G, Fitch MM, Manshardt RM, Slightom JL, Gonsalves D. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology* 107, 645-653 (2001)
- Torregrosa L, Bouquet A. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell Tissue und Organ Culture* 49, 53-62 (1997)
- Xue B, Ling K-S, Reid CL, Krastanova S, Sekiya M, Momol EA, Sule S, Mozsar J, Gonsalves D, Burr TJ. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a virE2 gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular und Developmental Biology-Plant* 35, 226-231 (1999)
- Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Reports* 19, 1203-1211 (2000)
- Yeh SD, Cheng YH, Bau HJ, Yu TA, Yang JS. Coat-protein transgenic papaya immune or highly resistant to different strains of papaya ringspot potyvirus. *Phytopathology* 87, S107 (1997)

Insektenresistenz

- Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, Fogher C, Delledonne M. Regeneration of *populus nigra* transgenic plants expressing a kunitz proteinase inhibitor (kti3) gene. *Molecular Breeding* 4, 137-145 (1998)
- Dandekar AM, McGranahan GH, Vail PV, Uratsu SL, Leslie C, Tebbets JS. Low levels of expression of wild type *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cryIA (c) sequences in transgenic walnut somatic embryos. *Plant Science* 96, 151-162 (1994)
- Dandekar AM, McGranahan GH, Vail PV, Uratsu SL, Leslie CA, Tebbets JS. High levels of expression of full-length cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Science* 131, 181-193 (1998)
- Dandekar AM, McGranahan GH, Vail PV, Uratsu SL, Leslie C, Tebbets JS. Expression of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* cryIA (C) sequences in transgenic somatic walnut embryos. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 018 Part A, 86 (1994)
- Delledonne M, Allegro G, Belenghi B, Balestrazzi A, Picco F, Levine A, Zelasco S, Calligari P, Confalonieri M. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding* 7, 35-42 (2001)
- Dowd PF, Lagrimini LM, Herms DA. Differential leaf resistance to insects of transgenic sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) expressing tobacco anionic peroxidase. *Cellular und Molecular Life Sciences* 54, 712-720 (1998)
- Genissel A, Viard F, Bourguet D. Population genetics of *Chrysomela tremulae*: a first step towards management of transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars *Populus tremula* X *P. tremuloides*. *Hereditas* 133, 85-93 (2000)
- Harcourt RL, Kyozuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Molecular Breeding* 6, 307-315 (2000)
- Heuchelin SA, McNabb HSJr, Klopfenstein NB. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Populus* X *euramericana* "Ogy" using the chimeric CaMV 35S-pin2 gene fusion.

- Canadian Journal of Forest Research 27, 1041-1048 (1997)
- Howe GT, Goldfarb B, Strauss SH. Agrobacterium-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Tissue und Organ Culture* 36, 59-71 (1994)
- Kang H, Hall RB, Heuchelin SA, McNabb HSJr, Mize CW, Hart ER. Transgenic Populus: In vitro screening for resistance to cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Journal of Forest Research* 27, 943-944 (1997)
- Kang H. Gene manipulation of pin 2(proteinase inhibitor II) to the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in transgenic poplar(Populus deltoides X P. nigra). *Journal of Korean Forestry Society* 86, 407-414 (1997)
- Kleiner KW, Ellis DD, McCown BH, Raffa KF. Field evaluation of transgenic poplar expressing a *Bacillus thuringiensis* cry 1A(a) d-endotoxin gene against forest tent caterpillar (Lepidoptera; Lasiocampidae) and gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) following winter dormancy. *Environmental Entomology* 24, 1358-1364 (1995)
- Leple JC, Bonadebottino M, Augustin S, Pilate G, Letan VD, Delplanque A, Cornu D, Jouanin L. Toxicity to chrysomela tremulae (coleoptera, chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding* 1, 319-328 (1995)
- Leroy T, Henry AM, Royer M, Altosaar I, Frutos R, Duris D, Philippe R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Reports* 19, 382-389 (2000)
- Mccown BH, McCabe DE, Russell DR, Robison DJ, Barton KA, Raffa KF. Stable transformation of populus and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports* 9, 590-594 (1991)
- Robison DJ, McCown BH, Raffa KF. Responses of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to transgenic poplar, *Populus* spp., containing a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin gene. *Environmental Entomology* 23, 1030-1041 (1994)
- Serres R, Stang E, McCabe D, Russell D, Mahr D, McCown B. Gene transfer using electric discharge particle bombardment and recovery of transformed cranberry plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117, 174-180 (1992)
- Shin D-I, Podila GK, Huang Y, Karnosky DF. Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 2059-2067 (1994)
- Sullivan J, Lagrimini LM. Transformation of Liquidambar styraciflua using Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Reports* 12, 303-306 (1993)
- Tao R, Dandekar AM, Uratsu SL, Vail PV, Tebbets JS. Engineering genetic resistance against insects in Japanese persimmon using the cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122, 764-771 (1997)
- Wang G, Castiglione S, Chen Y, Li L, Han Y, Tian Y, Gabriel DW, Han Y, Mang K, Sala F. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: Insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Research* 5, 289-301 (1996)
- Young MM, Reichert NA. Introduction of cryIAc and bar genes into kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *In Vitro Cellular und Developmental Biology. Animal* 36, 58 (2000)

Herbizidresistenz

- Bishop-Hurley SL, Zabkiewicz RJ, Grace L, Gardner RC, Wagner A, Walter C. Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plants are resistant to the herbicide Buster. *Plant Cell Reports* 20, 235-243 (2001)
- Brasileiro ACM, Tourneur C, Leple JC, Combes V, Jouanin L. Expression of the mutant

- Arabidopsis thaliana acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic popular plants. *Transgenic Research* 1, 133-141 (1992)
- Brukhin V, Clapham D, Elfstrand M, von Arnold S. Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. *Plant Cell Reports* 19, 899-903 (2000)
- Cabrera-Ponce JL, Vegas-Garcia A, Herrera-Estrella L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 15, 1-7 (1995)
- Confalonieri M, Belenghi B, Balestrazzi A, Negri S, Facciotto G, Schenone G, Delledonne M. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports* 19, 978-982 (2000)
- Devillard C. Genetic transformation of aspen *populus-tremula* x *populus-alba* by *agrobacterium-rhizogenes* and regeneration of plants tolerant to herbicide. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* 314, 291-298k (1992)
- Donahue RA, Davis TD, Michler CH, Riemenschneider DE, Carter DR, Marquardt PE, Sankhla N, Sankhla D, Haissig BE, Isebrands JG. Growth, photosynthesis, and herbicide tolerance of genetically modified hybrid poplar. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 2377-2383 (1995)
- Harcourt RL, Kyozuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Molecular Breeding* 6, 307-315 (2000)
- Meilan R, Ma C, Strauss SH. Stability of herbicide resistance and GUS expression in transgenic hybrid poplars during several years of field trials and vegetative propagation. *Hortscience* 34, 557 (1999)
- Riemenschneider DE, Haissig BE. Producing herbicide tolerant populus using genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* C58 - a summary of recent research. In: Ahuja MR (Ed.): *Biotechnology of woody plants*. Plenum Press/New York, 247-263 (1991)
- Shin DI, Podila GK, Huang Y, Karnosky DF. Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 2059-2067 (1994)

Pilzresistenz

- Liang H, Maynard CA, Allen RD, Powell WA. *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar with oxalate oxidase gene and the resistance of transgenic plants to oxalic acid and pathogenic fungi. *Phytopathology* 89, S45-S46 (1999)
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding* 4, 187-194 (1998)
- Mohamed R, Meilan R, Ostry ME, Michler CH, Strauss SH. Bacterio-opsin gene overexpression fails to elevate fungal disease resistance in transgenic poplar (*Populus*). *Canadian Journal of Forest Research-Journal Canadien de la Recherche Forestiere* 31, 268-275 (2001)
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19, 639-646 (2000)
- Zhu YJ, Tang CS, Fitch M, Moore P. Transformation with a pathogen-inducible stilbene synthase gene for increased fungal resistance in papaya. In *Vitro Cellular and Developmental Biology*. Animal 37, 26A (2001)

Bakterienresistenz

- Norelli JL, Aldwinckle HS, Destefano-Beltran L, Jaynes JM. Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77, 123-128 (1994)
- Reynold JP, Mourgues F, Norelli J, Aldwinckle HS, Brisset MN, Chevreau E. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. *Plant Science* 149, 23-31 (1999)

Verstärktes Wachstum

- Gallardo F, Fu J, Canton FR, Garcia-Gutierrez A, Canovas FM, Kirby EG. Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* 210, 19-26 (1999)

Oxidativer Stress

- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology* 109, 1047-1057 (1995)

Modifizierung des Ligningehalts

- Baucher M, Christensen JH, Meyermans H, Chen CY, Vandoorsselaere J, Leple JC, Pilate G, Petitconil M, Jouanin L, Chabbert B, Monties B, Vanmontagu M, Boerjan W. Applications of molecular genetics for biosynthesis of novel lignins. *Polymer Degradation und Stability* 59, 47-52 (1998)
- Baucher M, Chabbert B, Pilate G, Van Doorselaere J, Tollier M-T, Petit-Conil M, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inze D, Jouanin L, Boerjan W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiology* 112, 1479-1490 (1996)
- Dinus RJ. Genetic improvement of poplar feedstock quality for ethanol production. *Applied Biochemistry und Biotechnology* 91-3, 23-34 (2001)
- Dinus RJ, Payne P, Sewell NM, Chiang VL, Tuskan GA. Genetic modification of short rotation popular wood: Properties for ethanol fuel and fiber productions. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20, 51-69 (2001)
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Chapple C. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant Journal* 22, 223-234 (2000)
- Hu W-J, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Tsai C-J, Chiang VL. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17, 808-812 (1999)
- Jouanin L. Modification of lignin composition in trees by genetic engineering. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* 191, 155-159 (1997)
- Jouanin L, Goujon T, de Nadai V, Martin M-T, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology* 123, 1363-1373 (2000)
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple JC, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity

- have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* 119, 153-163 (1999)
- Meyermans H, Morreel K, Lapierre C, Pollet B, De Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, Devreese B, Van Beeumen J, Marita JM, Ralph J, Chen CY, Burggraeve B, Van Montagu M, Messens E, Boerjan W. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36899-36909 (2000)
- Ralph J, Lapierre C, Lu FC, Marita JM, Pilate G, Van Doorselaere J, Boerjan W, Jouanin L. NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into lignins of O-methyltransferase-deficient poplars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 86-91 (2001)
- Tsai C-J, Popko JL, Mielke MR, Hu W-J, Podila GK, Chiang VL. Suppression of O-methyltransferase gene by homologous *Sense* transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. *Plant Physiology* 117, 101-112 (1998)
- Van Doorselaere J, Baucher M, Chognot E, Chabbert B, Tollier M-T, Petit-Conil M, Leple J-C, Pilate G, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inze D, Boerjan Wt, Jouanin L. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant Journal* 8, 855-864 (1995)
- Zhong R, Morrison WH, III, Himmelsbach DS, Poole FL., Ye Z-H. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiology* 124, 563-577 (2000)