

**Transformationsstudien zur Aufklärung des  
molekularen Hintergrundes des kolumnaren  
Phänotyps bei *Malus x domestica***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Molekulargenetik,  
Gentechnische Sicherheitsforschung und -beratung



Verfasst und vorgelegt von  
Uwe Schwan,  
geboren am 25. August 1985  
in Limburg an der Lahn

Selters, 2018



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:



„Der Natur gegenüberzustehen und seinen Scharfsinn an ihren Rätseln zu erproben,  
gibt dem Leben einen ungeahnten Inhalt.“

-Alfred Wegener-



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Malus x domestica</i> .....	1
1.2	Kompakte Wuchsformen beim Apfel .....	4
1.3	Kolumnares Wachstum bei <i>Malus x domestica</i> .....	5
1.4	Molekulargenetischer Hintergrund des Kolumnarwuchses bei <i>Malus x domestica</i> .....	6
1.5	Transposons.....	10
1.6	Zielsetzung .....	15
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Grundlegende Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	16
2.1.1	Isolation genomischer DNA .....	16
2.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	16
2.1.3	Fällung von Nukleinsäuren .....	16
2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.1.5	Gelelektrophorese.....	20
2.1.6	Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	20
2.1.7	Sequenzierung von DNA-Sequenzen .....	21
2.1.8	RNA-Isolation.....	21
2.1.9	Reverse Transkription.....	22
2.1.10	Restriktion von DNA.....	22
2.1.11	Plasmid-Ligation und Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.1.12	Herstellung von kompetenten Zellen und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2.1.13	Plasmidpräparation .....	24
2.2	Gentechnische Transformation .....	26
2.2.1	Klonierung der Transformationsvektoren .....	26
2.2.2	Verwendete Agrobakterienstämme.....	30
2.2.3	Herstellung der zur Transformation verwendeten Bakteriensuspension ..	30
2.2.4	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>Malus x domestica</i> .....	31
2.2.5	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	34
2.2.6	Biolistische Transformation von <i>Malus x domestica</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> .....	36

2.3	Insertionsspezifische Nachweisverfahren zur genotypischen Charakterisierung transgener Linien.....	39
2.3.1	Nachweis transgener Sequenzen mittels Standard-PCR.....	39
2.3.2	Bestimmung der Anzahl der ins Genom inserierten T-DNA-Kopien mittels Southern Blot.....	40
2.3.3	Nachweis von direkten T-DNA-Repeats mittels „reverse Primer PCR“ ....	43
2.3.4	Bestimmung des Insertionsorts der T-DNA mittels inverser PCR .....	46
3	Ergebnisse .....	50
3.1	Charakterisierung transgener Linien von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	50
3.1.1	Phänotyp .....	50
3.1.2	Genotyp.....	53
3.1.3	Expressionsanalysen mittels qPCR .....	61
3.2	Charakterisierung transgener Linien von <i>Malus x domestica</i> .....	63
3.2.1	Phänotyp .....	65
3.2.2	Genotyp.....	67
3.2.3	Expressionsanalysen mittels qPCR .....	72
3.3	Etablierung der biolistischen Transformation.....	75
4	Diskussion.....	77
4.1	Charakterisierung transgener Linien von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	77
4.1.1	Kopienzahl der Transgene .....	77
4.1.2	Insertionsort der T-DNA .....	78
4.1.3	Expressionsanalysen .....	78
4.1.4	Fazit .....	80
4.2	Charakterisierung transgener Linien von <i>Malus x domestica</i> .....	80
4.2.1	Kopienzahl der Transgene .....	80
4.2.2	Insertionsort der T-DNA .....	81
4.2.3	Expressionsanalysen .....	81
4.2.4	Fazit .....	81
4.3	Biolistische Transformation und Genome Editing .....	82
4.4	<i>MdCo31</i> – Eine vermeintliche GA 2-Oxidase .....	83
4.5	Genregulation durch <i>cis</i> -regulatorische Elemente .....	87
4.6	Transposon-vermittelte Genregulation.....	94
5	Zusammenfassung.....	100

Webverzeichnis.....	101
Literaturverzeichnis.....	102
Anhang .....	122
Lebenslauf .....	132
Danksagung.....	134
Eidesstattliche Erklärung .....	135

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Agrobakterienstämme .....	30
Tabelle 2: PCR-Ansatz mit DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) .....	39
Tabelle 3: PCR-Programm "60x30DT" .....	39
Tabelle 4: Ansatz einer Restriktionsverdauung für einen Southern Blot .....	40
Tabelle 5: DIG-markierte Sonden.....	42
Tabelle 6: Ansatz einer rpPCR.....	43
Tabelle 7: Thermocycler-Einstellungen zur Durchführung der rpPCR.....	43
Tabelle 8: Für die rpPCR verwendete Primerpaare .....	44
Tabelle 9: Ansatz einer Restriktionsverdauung .....	46
Tabelle 10: Ligationsansatz zur Selbstligation von Restriktionsfragmenten.....	46
Tabelle 11: Ansatz der ersten Runde der iPCR .....	48
Tabelle 12: In der ersten Runde der iPCR verwendete Primer .....	48
Tabelle 13: Thermocycler-Einstellungen zur Durchführung der iPCR.....	48
Tabelle 14: Ansatz der zweiten Runde der inversen PCR.....	49
Tabelle 15: Übersicht der Phänotypen der transgenen Linien.....	51
Tabelle 16: Auswertung der rpPCR.....	54
Tabelle 17: Interpretation der Auswertung der rpPCR .....	55
Tabelle 18: Aussaat der aus Selbstung der transgenen Linien hervorgegangenen Samen der F1-Generation.....	56
Tabelle 19: Interpretation der Kreuzungsverhältnisse .....	57
Tabelle 20: Übersicht der <i>MdCo31</i> -Kopienzahl im Genom der transgenen Linien.....	58
Tabelle 21: BLAST-Ergebnisse nach Sequenzierung der erhaltenen Fragmente .....	60
Tabelle 22: <i>MdCo31</i> -Expression bei unterschiedlichen Wuchstypen (Studie 1) .....	61
Tabelle 23: <i>MdCo31</i> -Expression bei unterschiedlichen Wuchstypen (Studie 2) .....	62
Tabelle 24: Übersicht der erzeugten transgenen Linien.....	63
Tabelle 25: Nachweis von T-DNA-Repeats in Tandemform.....	69
Tabelle 26: BLAST-Treffer nach Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate .....	71
Tabelle 27 Transkriptionsaktivität von <i>MdCo31</i> und <i>Gypsy-44_ORF</i> in <i>Malus x domestica</i> .....	74
Tabelle 28: Harnstoff-Puffer .....	122
Tabelle 29: Dialysepuffer [10x].....	122
Tabelle 30: TBE-Puffer [10x].....	122
Tabelle 31: MOPS-Puffer [10x] .....	122
Tabelle 32: Stop-Puffer [10x].....	122
Tabelle 33: 1,2%ige Formaldehyd-Gele.....	123
Tabelle 34: GUS-Färbelösung (Sessions et al. 1999) .....	123
Tabelle 35: Denaturation-Solution.....	123
Tabelle 36: Neutralization Solution.....	123
Tabelle 37: SSC-Lösung [20x] .....	123
Tabelle 38: Post-Hyb-Wash-Solutions.....	124
Tabelle 39: Lösungen für die Plasmidpräparation nach Whitehead .....	124
Tabelle 40: MS Micro-Stammlösung [200x].....	125
Tabelle 41: MS Macro-/Micro-Stammlösung [20x] .....	125
Tabelle 42: B5 Vitamine [200x] .....	125
Tabelle 43: HA Vitamine [1000x].....	126
Tabelle 44: Erhaltungsmedium #5.....	126
Tabelle 45: Erhaltungsmedium #5 Pc3 (für 'Procats 28') .....	126
Tabelle 46: Vermehrungsmedium HA1 .....	127

Tabelle 47: Medium HA2 zur Ausbildung transformationsfähiger Blätter .....	127
Tabelle 48: Regenerations-/Selektionsmedium #53.....	127
Tabelle 49: Erhaltungsmedium für <i>Nicotiana tabacum</i> .....	128
Tabelle 50: Regenerations-/Selektionsmedium für <i>Nicotiana tabacum</i> .....	128
Tabelle 51: YM-Festmedium .....	128
Tabelle 52: YEP-Flüssigmedium.....	128
Tabelle 53: LB-Flüssig- bzw. Festmedium .....	129
Tabelle 54: MGL-Flüssigmedium .....	129
Tabelle 55: Für die qPCR verwendete Primer .....	130

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Transposition des Retrotransposons <i>Gypsy-44</i> .....	8
Abbildung 2: Graphische Darstellung des Ablaufs der qPCR .....	19
Abbildung 3: Binärer Vektor, pCAMBIA1305.1 (pCambia vectors) .....	26
Abbildung 4: Binärer Vektor, pART27 (Gleave 1992) .....	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips eines Partikelbeschusses.....	36
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Southern Blot.....	41
Abbildung 7: Schematische Darstellung direkter Repeats (head-to-tail) .....	45
Abbildung 8: Schematische Darstellung der inversen PCR .....	47
Abbildung 9: Unterschiedliche Phänotypen der transgenen Linien von <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Petit Havana .....	52
Abbildung 10: Unterschiedliche Internodienlängen, zunehmende Riffelung und dunkler werdendes Grün der Blätter .....	52
Abbildung 11: Ausgewählte interpretierbare Ergebnisse von Southern Blots bei transgenen Linien von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	53
Abbildung 12: head-to-tail-Repeat, Kopie mit unvollständiger T-DNA.....	55
Abbildung 13: <i>MdCo31</i> -Expression in transgenen Tabak-Individuen (Studie 1) .....	61
Abbildung 14: <i>MdCo31</i> -Expression in transgenen Tabak-Individuen (Studie 2) .....	62
Abbildung 15: Wuchstypen <i>in vitro</i> -kultivierter Individuen von <i>Malus x domestica</i> .....	67
Abbildung 16: Ergebnis der bei <i>Malus x domestica</i> durchgeführten Southern Blots ...	68
Abbildung 17: Transkriptionsaktivität von <i>MdCo31</i> in <i>Malus x domestica</i> .....	72
Abbildung 18: Transkriptionsaktivität von <i>Gypsy-44_ORF</i> in <i>Malus x domestica</i> .....	73
Abbildung 19: Biologisch beschossene Blätter nach Durchführung eines GUS-Tests	76
Abbildung 20: GA-Biosynthesewege verschiedener Organismen.....	85
Abbildung 21: Modellvorstellungen zur differenziellen Regulation von <i>MdCo31</i> .....	97

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
3C	Chromosome Conformation Capture
4C	Circularized Chromosome Conformation Capture
5C	Chromosome Conformation Capture Carbon Copy
A14	Nicht-kolumnar wachsender Apfelklon 'A14-190-93'
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
APHIS	Animal and Plant Health Inspection Service
Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CFIA	Canadian Food Inspection Agency
ChIA-PET	Chromatin Interaction Analysis with Paired-End-Tag sequencing
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CNS	Konservierte nicht-kodierende Sequenz
Co	Kolumnar
CRE	<i>cis</i> -regulatorisches Element
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Ct-Wert	Cycle threshold
DESTATIS	Statistisches Bundesamt
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DHS	DNase I hypersensitive site
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

GAG	Group specific antigen, ein Capsid-like Protein
GEEN	Genome editing with engineered nucleases
GM	Genetically modified
GMO	Genetically modified organism
GOI	Gene of Interest
GRAS	generally recognized as safe
gRNA	guide RNA
GUS	Glucuronidase
HC	Health Canada
HR	Homologe Rekombination
Kg	Kilogramm
LB	Left Border
LCR	Locus Control Region
lncRNA	long non-coding RNA
LTR	Long Terminal Repeat
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MWCO	Molecular weight cut-off
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molare Masse
min	Minute
miRNA	microRNA
mM	Millimolar
MITE	Miniature Inverted-repeat Transposable Elements
MULE	<i>Mutator</i> -like element
ncRNA	non-coding RNA
ng	Nanogramm
NHEJ	non-homologous end-joining
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	Open Reading Frame
ORI	Replikationsursprung
PBS	Primerbindungsstelle

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPT	Polypurintrakt
POL	Polyprotein, dass für Protease-, Reverse Transkriptase-, RNase H- und Integrase-Aktivität verantwortlich ist
'Procats'	Kolumnare Apfelsorte 'Procats28'
PTGS	Posttranskriptionelles Gen-Silencing
qPCR	quantitative Real Time PCR
RB	Right Border
RdDM	RNA-induzierte DNA-Methylierung
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute
RS	Restriktionsschnittstelle
SAM	Sprossapikalmeristem
siRNA	small interfering RNA
TALEN	transcription activator-like effector-based nucleases
TALE	transcription activator-like effector
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen
TGS	Transkriptionelles Gen-Silencing
T <sub>Hyb</sub>	Hybridisierungstemperatur
Ti-Plasmid	Tumor-induzierender Plasmid
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TSD	Target Site Duplication
TSS	Transcription Start Site
Ü/N-Kultur	Über-Nacht-Kultur
UTR	Untranslated Region
V	Volt
'Wijcik'	Kolumnare Apfelsorte 'McIntosh Wijcik'
USDA	United States Department of Agriculture
ZFN	Zinkfingernukleasen

# 1 Einleitung

## 1.1 *Malus x domestica*

Der Kulturapfel *Malus x domestica* war mit einem weltweiten Ertrag von über 80 Millionen Tonnen und einer Anbaufläche von über 5,2 Millionen Hektar verteilt auf 95 Länder eine der am häufigsten angebauten Obstarten im Jahr 2013 (FAO, 2016). Mit 2,4 Millionen Hektar und fast 40 Millionen Tonnen war China der Hauptproduzent, gefolgt von den USA und der Türkei mit 4,1 bzw. 3,1 Millionen Tonnen (FAO, 2016). In Deutschland wurden im Jahr 2015 auf 31,4 Tausend Hektar insgesamt fast 1 Million Tonnen Äpfel produziert. Damit ist der Apfel vor Pflaumen/Zwetschgen und Birnen mit 46,9 bzw. 43 Tausend Tonnen die flächen- und ertragsstärkste Obstart in Deutschland (DESTATIS, 2016). Der Großteil der Apfelproduktion in Deutschland findet Verwendung als Tafelobst (70,5 %), die übrige Vermarktung erfolgt als Verwertungs- und Industrieobst (DESTATIS, 2016). Insgesamt ist der Apfel mit einem Pro-Kopf-Konsum von 23,5 kg im Erntejahr 2013/2014 die beliebteste Obstart in Deutschland (Statista, 2016).

Systematisch handelt es sich bei dem Kulturapfel *Malus x domestica* um ein Kernobstgewächs aus der Familie der Rosengewächse (Rosaceae). Die zunächst als eigenständig geführte Unterfamilie der Kernobstgewächse wurde 2007 aufgrund von molekularbiologischen Untersuchungen (Potter et al. 2007) in die Unterfamilie der Spiraeoideae integriert. Seitdem werden die Kernobstgewächse (Pyrinae) als Subtribus des Tribus Pyreae geführt.

Im Gegensatz zu allen anderen Gattungen der Rosengewächse mit sieben, acht oder neun Chromosomenpaaren besitzt *Malus x domestica* wie auch alle anderen Arten der einstigen Unterfamilie der Pomoideae einen haploiden Chromosomensatz  $x = 17$  (Tromp et al, 2005). Die unter Rosaceae ungewöhnlich hohe Chromosomenzahl könnte zum einen das Ergebnis einer Allopolyploidisierung zwischen zwei Arten der Unterfamilien der Spiraeoideae ( $x = 9$ ) und der Amygdaloideae ( $x=8$ ) (Sax 1933; Chevreau et al. 1985) oder einer Kombination aus Autopolyploidisierung und Aneuploidisierung eines Vorfahrens wie *Gillenia* mit  $x = 9$  sein (Evans und Campbell 2002). Phylogenetische Untersuchungen auf Basis des veröffentlichten Genoms von *Malus x domestica* unterstützen die zweite Hypothese (Velasco et al. 2010).

Aus den gleichen Untersuchungen geht hervor, dass die in der Tian Shan Region in Zentralasien beheimatete Wildart *M. sieversii* die größte genetische Ähnlichkeit mit *Malus x domestica* aufweist. Auch Harris et al. (2002) kommen zu dem Schluss, dass es sich bei den frühesten Selektionen des domestizierten Apfels um reine Wildarten ohne Beteiligung anderer Arten gehandelt haben könnte und erst spätere Hybridisierungen zu neuen Kultursorten mit wirtschaftlich wichtigen Eigenschaften führten.

Des Weiteren geht aus neueren Studien mit Mikrosatelliten hervor, dass viele der heute kultivierten Sorten infolge bidirektionalen Genflusses ein engeres Verwandtschaftsverhältnis zu dem europäischen Wildapfel *M. sylvestris* aufweisen als zu ihrem asiatischen Vorfahren *M. sieversii* (Cornille et al. 2012). Noiton und Alspach (1996) haben festgestellt, dass der Ursprung von 64 % der 439 von ihnen untersuchten Apfelselektionen auf die fünf Sorten 'McIntosh', 'Golden Delicious', 'Jonathan', 'Cox's Orange Pippin' und 'Red Delicious' zurückzuführen ist. Trotzdem weist *Malus x domestica* aufgrund von starkem Polymorphismus einen hohen Grad an Heterozygotie und damit einhergehend eine hohe Diversität auf (Hemmat et al. 1994; Pereira-Lorenzo et al. 2007; Velasco et al. 2010; Gross et al. 2014).

Viele Gene mit Einfluss auf die Fruchtqualität (Oraguzie et al. 2004; King et al. 2000), Physiology (Lawson et al. 1995), Krankheits- (Alston 1970; Aldwinckle 1977) und Schädlingsresistenz (Sandanayaka et al. 2003; Stankiewicz-Kosyl et al. 2005; Calenge et al. 2004) sowie Wuchsregulation (Liebhard et al. 2003; Alston 1976; Lapins und Watkins 1973) sind identifiziert und finden Verwendung in Züchtungsprogrammen.

Die klassische Kreuzung zweier Eltern ist bis heute die meistgenutzte Methode zur Züchtung neuer Apfelsorten. Die erste durch Kreuzung entstandene Kultursorte wird Thomas Andrew Knight (1759-1838) zugeschrieben (Pereira-Lorenzo et al. 2009). Eine Alternative zur klassischen Züchtung bietet die Selektion von Mutationen und Chimären, die durch vegetative Vermehrung eine stabile Merkmalsausprägung aufweisen (Janick und Moore 1996).

Die erste transgene Apfelpflanze geht auf das Jahr 1989 zurück (James et al. 1989). Allerdings wurde erst 2015 durch den Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) des US Departement of Agriculture (USDA) die Genehmigung für die Vermarktung der ersten transgenen Apfelsorten in den Vereinigten Staaten (U.S. Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)

2015) und kurz darauf durch Health Canada (HC) und die Canadian Food Inspection Agency (CFIA) in Kanada erteilt (Health Canada 2015).

Die gentechnische Transformation bietet den großen Vorteil, dass nutzbringende Gene gezielt in das Genom marktfähiger Sorten integriert werden können und dabei die Merkmale der ursprünglichen Sorte erhalten bleiben (Pereira-Lorenzo et al. 2009). Aufgrund des hohen Grades an Heterozygotie und der damit verbundenen starken Aufspaltung als Resultat der klassischen Kreuzungszüchtung ist dies bei der Apfelmehltau von besonderer Bedeutung. Schwieriger wird es, wenn die Ausprägung eines Merkmals von QTLs und nicht von einem einzelnen Gen abhängig ist. Die generelle öffentliche Ablehnung gegenüber gentechnisch veränderten Organismen (GMOs) verhindert allerdings die kommerzielle Veränderung bestehender bzw. die Erzeugung neuer Sorten mittels gentechnischer Transformation.

Bei den Züchtungszielen haben neben dem Ertrag und der Fruchtqualität, die Geschmack, Aussehen, Inhaltsstoffe und Lagerbarkeit bzw. Haltbarkeit umfasst, vor allem Krankheits- und Schädlingsresistenz oberste Priorität. Während Kultursorten mit Resistenz gegen Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) und Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha*) bereits Standard sind, ist ein aus dem Wildapfel stammendes Resistenzgen gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) zwar bekannt, jedoch bislang nur auf biotechnologische Weise in eine Kultursorte überführt worden (Broggini et al. 2014). In Regionen mit extremen klimatischen Bedingungen ist die Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen ebenfalls ein Züchtungsziel.

Aus einer unter Züchtern durchgeführten Umfrage (Laurens 1998) geht hervor, dass der Wuchstyp bei der Züchtung die am häufigsten genannte Nebenzugabe darstellt. Der häufig als Intensivkultur betriebene Apfelanbau ist sehr arbeitsaufwändig. Der größte Aufwand entfällt auf die Ernte, Schnittmaßnahmen, Ausdünnung, Bewässerung, Düngung, Wachstumsregulierung sowie Schädlings- und Krankheitskontrolle (Gallardo et al. 2010; Galinato et al. 2014). Zur Steigerung der Effizienz des Apfelanbaus ist vor allem die Anpassung des Habitus ein probates Mittel. Kleinere, kompaktere Wuchsformen reduzieren den Aufwand für erforderliche Schnittmaßnahmen und Arbeiten wie Ausdünnung sowie Schädlings- und Krankheitskontrolle. Ohne Beeinträchtigung durch Schnittmaßnahmen kann der Kulturapfel eine Höhe von 8 bis 15 Metern erreichen und eine weit ausladende Baumkrone ausbilden. Stark abweichende Wuchshöhen werden vor allem durch spezielle Dwarfing-Unterlagen in

Verbindung mit Schnittmaßnahmen erzielt. So gehen die ersten Propfungen mit dem Ziel der Wachstumsregulierung auf das 16. Jahrhundert zurück (Tubbs 1973).

Ein Ansatz zur Beeinflussung des Wuchstyps aus der neueren Vergangenheit richtet den Fokus auf die für die Ausprägung verschiedener Habitus verantwortlichen Gene (Sampson und Cameron 1965; Decourtye 1967; Decourtye und Lantin 1969; Alston 1976). Um ein solches Gen handelt es sich auch bei *Co*, dem Kolumnargen, verantwortlich für die kolumnare Wuchsform beim Apfel (Lapins und Watkins 1973).

## 1.2 Kompakte Wuchsformen beim Apfel

Der Wuchstyp beim Apfel definiert sich aus der Internodienlänge, der Wüchsigkeit, dem Verhältnis von Fruchtrieben zu vegetativen Seitentrieben und dem Astwinkel bzw. dem Winkel von Seitentrieben (Blazek 1992). Diese Unterschiede sind von gartenbaulicher Signifikanz, da sie einen Einfluss auf Kulturarbeiten und Ertrag haben (Quinlan und Tobutt 1990). Geeignete Kriterien zur Unterscheidung kompakter Wuchsformen vom Standardtyp sind laut Lapins und Fisher (1974) die Länge einjähriger Triebe, die Länge der Internodien, die Dicke einjähriger Triebe vergleichbarer Länge, die Länge und Dicke zweijähriger Triebe sowie die Anzahl vegetativer Triebe und die Anzahl Fruchtriebe an zweijährigen Seitentrieben. Grundlegend wird zwischen verschiedenen kompakten Wuchstypen unterschieden, die Grenzen sind jedoch nicht klar definiert und werden häufig unterschiedlich ausgelegt.

Der sogenannte Spurtyp wurde in Form einer Mutation bei 'Delicious' mit der Bezeichnung 'Okonomo Delicious' in den 1920ern erstmals erwähnt, fand allerdings erst in den 1950ern größere Beachtung (Westwood und Zielinski 1966; Quinlan und Tobutt 1990). Spurtypen sind charakterisiert durch einen aufrechten Wuchs, einen kräftigen Stamm mit kurzen Internodien und wenigen, aufrecht wachsenden Seitentrieben sowie gesteigerte Ausbildung von Fruchtrieben (Blazek 1992). Die Architektur führt zu einer erhöhten Blattdichte. Außerdem weisen die Blätter ein dickeres Palisadengewebe auf, sind dadurch dicker und enthalten mehr Chlorophyll, wodurch sie dunkler erscheinen. Zusätzlich wird die Ertragsreife früher erreicht und die bei gleichbleibender Anzahl verkürzten Internodien führen zu einer um circa 10 bis 15 % reduzierten Baumhöhe (Arasu 1968). Vor allem diese Eigenschaft als Mittel der Wuchsregulation weckte das Interesse der Anbauer und Züchter.

Der Kompakttyp ist ebenfalls durch einen aufrechten Wuchs mit verkürzten Internodien und einen erhöhten Blattflächenindex charakterisiert. Im Vergleich zum Spurtyp ist der Stamm weniger kräftig und es werden weniger Fruchtriebe ausgebildet. Die Verzweigung ist dagegen erhöht, wodurch mit zunehmendem Alter die Tendenz entsteht, eine Krone auszubilden (Blazek 1992). In der Praxis werden die Begriffe Spur- und Kompakttyp häufig für den selben Wuchstyp verwendet.

Beim Kolumnartyp, der dem Spurtyp ähnelt, handelt es sich um einen weiteren Wuchstyp. Kolumnare Bäume besitzen einen stämmigen Wuchs und zeichnen sich durch ein fast vollständiges Fehlen von Seitentrieben aus; stattdessen entwickeln sich fast alle Achselknospen zu Fruchtrieben. Neben der erhöhten Fruchtdichte sind Baumvolumen, Wüchsigkeit und Internodienlänge stärker reduziert als beim Spur- und Kompakttyp. Die Wuchshöhe ist dagegen weniger stark reduziert (Blazek 1992).

Der auf die *Co*-Mutation zurückzuführende kolumnare Charakter wird hauptsächlich Nachkommenschaften von 'McIntosh Wijcik' – und 'McIntosh Bendig', der vermutlich mit 'McIntosh Wijcik' genetisch identisch ist und keine weitere Erwähnung findet – zugeschrieben (Lapins 1976). Nachkommenschaften anderer Kultursorten mit kompaktem Wuchstyp wie 'Alkmene' und 'Melba' sowie Spur-Mutanten von 'Delicious', 'Golden Delicious' und 'McIntosh', die einen ähnlichen Wuchs aufweisen, erben den kolumnar-artigen Charakter mit deutlich geringerer Rate und unterscheiden sich in der Ausprägung des Wuchstyps zu Nachkommenschaften von 'McIntosh Wijcik' (Lapins 1976). Während Kreuzungsversuche darauf hindeuten, dass an der Ausprägung des Spur- und des Kompakttyps mehrere "major genes" und zusätzliche "minor genes" beteiligt sind, hat sich gezeigt, dass eine einzelne Transposition grundlegende Ursache des kolumnaren Wuchstyps ist (Otto et al. 2014).

### **1.3 Kolumnares Wachstum bei *Malus x domestica***

In Deutschland entfällt der Vorteil der Marktnähe aufgrund der hohen Arbeitskosten, die Wettbewerbsfähigkeit deutscher Apfelanbauer ist gefährdet (P. Braun, persönliche Mitteilung). Der Einsatz von Vollerntern ist aufgrund der Architektur von Standard-Apfelbäumen nicht möglich. Die Wuchsform kolumnarer Apfelbäume ermöglicht dagegen die Realisierung einer mechanischen Ernte (Wolters et al. 2013a) und bietet zusätzliches wirtschaftliches Potential. Durch die mit der Wuchsform verbundenen Möglichkeiten bei Anbau und Bewirtschaftung lassen sich Ertrag, Arbeitseffizienz sowie

Dünge-, Wasser-, und Pflanzenschutzmittelverbrauch optimieren. Zudem bietet der Anbau kolumnarer Apfelsorten ökologische Vorteile. In Deutschland wird in nahezu allen kommerziellen Apfelbetrieben auf die Verwendung wuchsreduzierender Unterlagen zurückgegriffen. Das damit einhergehende verminderte Wurzelwachstum wirkt sich negativ auf die Konkurrenzfähigkeit der Bäume im Wettbewerb um Wasser und Nährstoffe mit der Begleitvegetation aus. In der Folge ist es notwendig das Wachstum der Begleitvegetation auf ein Minimum zu beschränken. Die Verwendung wüchsiger Unterlagen in Kombination mit kolumnarem Edelreis bietet die Möglichkeit eines eingeschränkten Managements der Begleitvegetation und damit der Förderung der Biodiversität (P. Braun, persönliche Mitteilung).

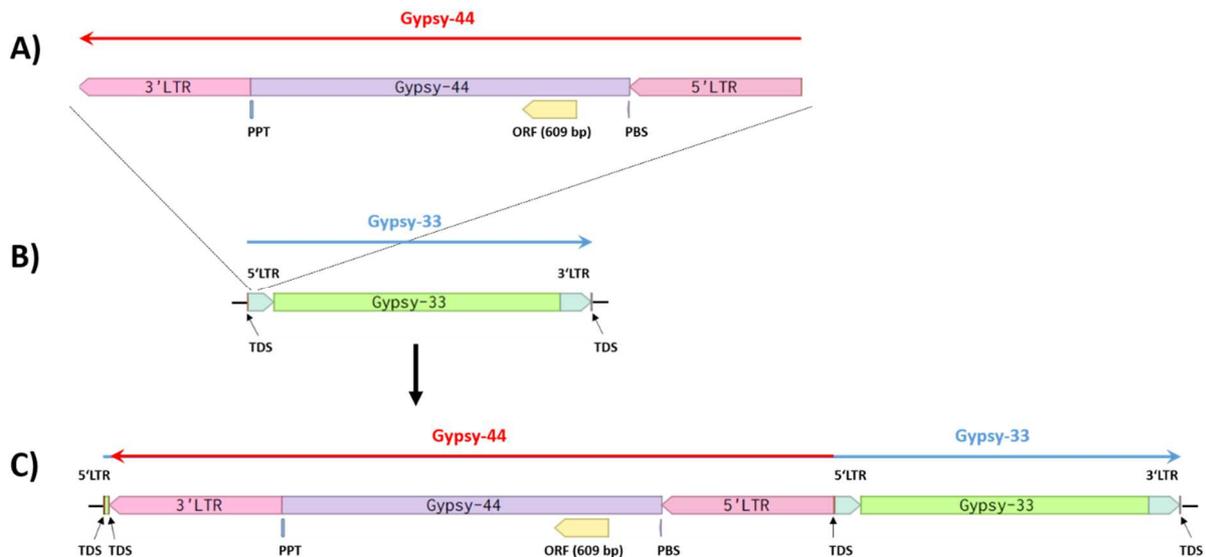
Zwar lassen sich über genetische Marker kolumnare Bäume schon im Sämlingsstadium von nicht-kolumnaren unterscheiden, jedoch gibt es abhängig vom genetischen Hintergrund eine große Variation bei der Intensität der Ausprägung des kolumnaren Wachses (Wit et al. 2004 und P. Braun, persönliche Mitteilung). Kultursorten mit stark kolumnarer Merkmalsausprägung bieten anbautechnische Nachteile. Extrem kompakter Wuchs kann die Anfälligkeit für Schädlings- und Pathogenbefall fördern und verhindert gleichzeitig eine hinreichende Benetzung mit Pflanzenschutzmitteln. Ein gemäßigt kompakter Wuchs ist daher für den Anbau besser geeignet und bietet zudem eine bessere und gleichmäßigere Belichtung sowie ein besseres Blatt-Frucht-Verhältnis, was sich positive auf die Fruchtqualität auswirkt (P. Braun, persönliche Mitteilung).

Zur Selektion des gewünschten Wuchstyps bereits im frühen Sämlingsstadium sind detailliertere Kenntnisse der der Ausprägung der kolumnaren Merkmale zugrundeliegenden Prozesse notwendig.

### **1.4 Molekulargenetischer Hintergrund des Kolumnarwachses bei *Malus x domestica***

Auf Grundlage von Kreuzungsversuchen (Lapins 1969; Lapins und Watkins 1973; Tobutt 1994; Hemmat et al. 1997; Wit et al. 2000, 2000; Kim et al. 2003; Bailey et al. 2012; Moriya et al. 2012; Baldi et al. 2013) wurde bis zur Aufklärung des genetischen Hintergrundes vermutet, dass ein dominantes Allel eines Gens (*Co*) für die Ausprägung des kolumnaren Wuchstyps verantwortlich ist (Lapins 1976; Looney und Lane 1984; Lapins und Watkins 1973).

Mit Hilfe von molekularen Markern konnte der *Co*-Locus der Linkage group 10, der von Conner et al. (1995) erstellten Genkarte NY 75441-58 zugeordnet werden (Conner et al. 1997; Hemmat et al. 1997). Später konnte die genaue Position aufgrund mehrerer Markerstudien (Kim et al. 2003; Tian et al. 2005; Moriya et al. 2009) weiter eingeschränkt werden. Nach Veröffentlichung des Genoms von *Malus x domestica* 'Golden Delicious' (Velasco et al. 2010) und der Lokalisation der Linkage group 10 auf Chromosom 10 konnte die Position des *Co*-Locus auf Grundlage von drei weiteren Markerstudien (Bailey et al. 2012; Moriya et al. 2012; Baldi et al. 2013) auf einen Bereich von 18,52 bis 19,09 Mb eingegrenzt werden. Innerhalb dieser Grenzen an Position 18,8 Mb detektierten Wolters et al. (2013b) eine genomische Veränderung zwischen 'Wijcik' und dessen Wildtyp 'McIntosh' in Form einer 1956 bp großen Insertion. Nur kurze Zeit später wurde nachgewiesen, dass die Detektion unvollständig war und es sich bei der Insertion um das 8,2 kb große Ty3/Gypsy-Retrotransposon *Gypsy-44* handelte, welches eine replikative Transposition durchlaufen hat (Otto et al. 2014). Das Retrotransposon besitzt zwei identische Long Terminal Repeats (LTRs) mit einer Länge von 1951 bp, eine konservierte Primerbindungsstelle (PBS) sowie einen Polypurintrakt (PPT) und wird von einer 5 bp langen Target Site Duplication (TSD) flankiert (Otto et al. 2014). Die Insertion erfolgte in Bezug auf das genomische Contig in 3' zu 5'-Orientierung, in das 5' LTR von *Gypsy-33*, einem weiteren LTR-Retrotransposon (**Abbildung 1**). Da es sich hierbei um den einzigen genomischen Unterschied zwischen 'McIntosh' und 'Wijcik' in der eingegrenzten *Co*-Region handelt, ist davon auszugehen, dass die replikative Transposition von *Gypsy-44* die gesuchte *Co*-Mutation darstellt (Petersen 2014). Die Insertion erfolgte in eine genarme Region; dabei wurde keine Kodierungssequenz eines bekannten Gens unterbrochen. Aufgrund des Fehlens der Transposon-spezifischen, für *gag* und *pol* kodierenden Open Reading Frames (ORFs) handelt es sich bei dem kolumnar-spezifischen *Gypsy-44*-Retrotransposon wahrscheinlich um eine nicht-autonome Kopie. Trotzdem sind mehrere ORFs unbekannter Funktion vorhanden, von denen zumindest der längste (609 bp) aktiv (Otto et al. 2014) und in hohem Maß (Petersen 2014) transkribiert wird. Des Weiteren deuten Transkriptomanalysen (RNA-Seq) darauf hin, dass *Gypsy-44* im Sprossapikalmeristem (SAM) von kolumnaren Bäumen (Procats) geringfügig höher exprimiert wird als in nicht-kolumnaren (A14). Auf welchen ORF sich die Aussage bezieht, geht aus der Analyse von Petersen (2014) nicht hervor.



**Abbildung 1: Darstellung der Transposition des Retrotransposons Gypsy-44**

Die Ausbildung des kolumnaren Phänotyps korreliert mit der replikativen Transposition des 8,2 kb großen LTR-Retrotransposon *Gypsy-44* (A) in das 4,0 kb große LTR-Retrotransposon *Gypsy-33* (B). Die Insertion des von einer 5 bp langen Target Site Duplication (TSD) flankierten *Gypsy-44* erfolgte in Bezug auf das genomische Contig in 3' zu 5'-Orientierung, in das 5' LTR von *Gypsy-33* (C). Zusätzlich sind weitere Sequenzbereiche wie Long Terminal Repeats (LTRs), eine konservierte Primerbindungsstelle (PBS), ein Polypurintrakt (PPT) sowie der mit 609 bp längste von mehreren kurzen Open Reading Frames (ORFs) dargestellt.

Krost et al. (2013) weisen eine statistisch abgesicherte Anhäufung von differenziell regulierten Genen zwischen der kolumnaren Sorte 'Procats28' ('Procats') und dem nicht-kolumnaren Klon 'A14-190-93' (A14) auf dem von der Transposition betroffenen Chromosom 10 nach. Demnach sind 5 von 16 stark differenziell exprimierten Genen auf Chromosom 10 lokalisiert, während die restlichen elf Gene auf den übrigen Chromosomen verteilt liegen. Dies führte zu der Hypothese, dass *Gypsy-44* einen Einfluss auf die Expression von in der Nähe liegenden Genen besitzt (Petersen 2014). Von den sechs Genen, die sich innerhalb einer Region von 50 kb um die Insertion herum (25 kb upstream bzw. downstream) befinden, konnten Wolters et al. (2013b) nur bei dem direkt downstream von *Gypsy-44* benachbartem Gen *dmr6-like* (*MdCo31*) eine gewebespezifische, signifikant differenzielle Expression feststellen.

Abgeleitet von der Begebenheit, dass sich Achselknospen von kolumnaren Individuen anstelle von Seitentrieben zu Fruchtspiessen entwickeln, kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation, die zur Ausprägung des kolumnaren Phänotyps führt, zu einem frühen Entwicklungsstadium erfolgt. Dementsprechend wiesen Achselknospen von Individuen vom kolumnar-wachsenden 'McIntosh Wijcik' im Vergleich zum nicht-

kolumnar-wachsenden Wildtyp 'McIntosh' zum Zeitpunkt des Austriebs eine 14-fach höhere *MdCo31*-Expression auf (Wolters et al. 2013b). Des Weiteren konnten zum Ende der Vegetationsperiode in Sprossspitzen vom nicht-kolumnar wachsenden Klon A14 fast keine *MdCo31*-Transkripte detektiert werden, während die Menge in Individuen von kolumnar-wachsenden 'Procats' 30-200 mal höher war (Petersen 2014). In sehr jungen, noch in der Entwicklung befindlichen Blättern ist die Expression bei 'McIntosh' schwach und im Vergleich dazu bei 'Wijcik' 10-fach erhöht (Petersen 2014). Dagegen werden in vollständig entwickelten Blättern beider Phänotypen nur vernachlässigbare Mengen von *MdCo31* exprimiert (Wolters et al. 2013b; Otto et al. 2014). Zusammengefasst korreliert die Ausprägung des kolumnaren Wuchstyps mit einer gesteigerten Expression von *MdCo31* in sich entwickelnden Geweben.

Gleichzeitig wird eine Vielzahl an Genen gewebeübergreifend zwischen kolumnar- und nicht-kolumnar-wachsenden Individuen differenziell exprimiert. Krost et al. (2012) analysierten SAM-Transkriptome mittels 454 und Illumina next generation sequencing (NGS)-Techniken. Demnach sind Gene, beteiligt an Lichtreaktionen, mitochondrialem Elektronentransport, Lipid-Metabolismus, Zellwandmodifikation, Chromatin-Struktur, RNA-Prozessierung und Proteinbiosynthese in kolumnaren 'Procats' im Vergleich zu nicht-kolumnaren A14 herunterreguliert. Gene mit Beteiligung an Zellwandmodifikation, Transport und Proteinmodifikation sowie Terpenoid- und Tryptophanbiosynthese sind dagegen in 'Procats' hochreguliert. Eine Analyse der mit der Phytohormonsynthese, -transport und -Signaltransduktion in Verbindung stehenden, differenziell regulierten Gene ergab, dass an Synthese und Signaltransduktion von Gibberellinen beteiligte Gene herunterreguliert sind. Gene, die an IAA-, Cytokinin-, Jasmonat- und Brassinosteroid-Biosynthese und -Signaltransduktion beteiligt sind, sind dagegen in kolumnaren Individuen hochreguliert (Krost et al. 2014; Zhang et al. 2012c).

Die direkte Messung der Phytohormonkonzentration hat gezeigt, dass sich die jahreszeitlichen Schwankungen des Phytohormonspiegels bei kolumnaren Individuen und 'McIntosh' ähneln, die endogene IAA und Cytokinin-Konzentration liegt aber bei ersteren höher (Watanabe et al. 2004; Watanabe et al. 2008). Da der Konzentrationsunterschied bei stärker kolumnar wachsenden Individuen höher ausfällt, ist anzunehmen, dass die Cytokininkonzentration mit der Ausprägung des kolumnaren Wuchstyps in Verbindung steht (Watanabe et al. 2004). Die beobachteten Veränderungen des Phytohormonspiegels werden auf differenziell exprimierte Gene infolge der *Co*-Mutation zurückgeführt (Petersen 2014).

## 1.5 Transposons

Transposons sind parasitäre DNA-Elemente und stellen eine potentielle Bedrohung für die Integrität von Genomen dar. Sie sind allgegenwärtig in Eukaryoten – nur wenige Arten mit sehr kleinen Genomen sind die Ausnahme – und bilden einen wesentlichen Anteil der meisten Pflanzengenome. Anzahl und Verteilung der Transposons kann selbst zwischen zwei eng verwandten Arten stark variieren (Kidwell 2002; Kumar und Bennetzen 1999).

### Klassifizierung eukaryotischer Transposons

Transposons werden in zwei Klassen eingeteilt (Finnegan 1989). Retroelemente der Klasse I vollziehen über eine RNA-Zwischenstufe mittels eines „copy and paste“-Mechanismus eine replikative Transposition. Jeder vollständige Replikationszyklus erzeugt eine neue zusätzliche Kopie. Klasse II Transposons „springen“ im Genom über eine DNA-Zwischenstufe und unter Einwirkung einer Transposase. Zusätzlich wird innerhalb der Klasse II zwischen zwei Unterklassen unterschieden. Während Transposons der Unterklasse I mittels „cut and paste“-Mechanismus ihre Position im Genom verändern, verfügen Vertreter der Unterklasse II ebenso wie Transposons der Klasse I über einen „copy and paste“-Mechanismus (Einordnung nach Wicker et al. 2007). Transposons unterschiedlicher Ordnung unterscheiden sich im zugrundeliegenden Insertionsmechanismus und damit auch in Organisation und Enzymologie.

Die vorherrschende Ordnung im Pflanzenreich sind die evolutionär eng mit Retroviren verwandten (Wicker et al. 2007), der Klasse I angehörenden LTR-Retrotransposons, die einen Großteil pflanzlicher Genome bilden. Die Länge der namensgebenden flankierenden LTRs reicht von wenigen 100 bis zu mehr als 5.000 Basenpaaren. Bei der Integration entsteht eine 4 bis 6 bp große TSD. Häufig liegen LTR-Retrotransposons als Abfolge ineinander „verschachtelter“ (nested) Insertionen vor.

Autonome LTR-Retrotransposons enthalten mindestens zwei für die Transposition benötigte Gene, *gag* und *pol*. Das *gag*-Gen kodiert für ein Capsid-like Protein und bei POL handelt es sich um ein Polyprotein, das für Protease-, Reverse Transkriptase-, RNase H- und Integrase-Aktivität verantwortlich ist. Nicht-autonome Transposons können trotz des Fehlens dieser Gene durch autonome Partner aktiviert werden und transpositionieren. Die zwei am häufigsten vorkommenden Oberfamilien *Gypsy* und

*Copia* unterscheiden sich in der Anordnung der ORFs von Reverser Transkriptase, Integrase und RNase H. Pflanzenarten sind nicht auf eine LTR-Retrotransposon-Familie beschränkt, entsprechend können große Genome wie die von Mais, Weizen und Hafer tausende Familien enthalten.

Die Einteilung in Familien erfolgt über Sequenzhomologien. Bei mangelnder Übereinstimmung mit bekannten Familien werden nicht-kodierende Regionen (PBS, PPT, etc.) und die Terminal Repeats zur Klassifizierung herangezogen. Terminal Repeats bieten die höchste Spezifität zur Bestimmung der Familie, da es sich hierbei um die am schnellsten verändernden Abschnitte von Transposons handelt. Anhand der Sequenzidentität zwischen den LTRs eines Transposons lassen sich darüber hinaus Rückschlüsse darüber ziehen, wie lange ein Integrationsevent zurückliegt (SanMiguel et al. 1998). Werden unabhängig von Aktivität und Funktionalität alle zur Transposition notwendigen Domänen kodiert, wird ein Transposon als autonom definiert.

#### Erkennung, Regulierung und Reaktivierung

Zur Regulierung müssen Transposons zunächst von den Wirtszellen erkannt werden. Weil weder einzelne Sequenzen noch Motive oder Strukturen von allen Transposonfamilien geteilt werden, erfolgt die Erkennung nicht über die Sequenzidentität. Stattdessen wird von Transposons transkribierte RNA von den Wirtszellen detektiert und verschiedene Regulationsmechanismen induziert, welche die Erkennung und Stilllegung bzw. Entfernung von Transposons beinhalten (Yoder et al. 1997). Zu diesen Regulationsmechanismen gehören das „small interfering RNA“ (siRNA)-vermittelte posttranskriptionelle Gen-Silencing (PTGS) auch RNA-Interferenz (RNAi) genannt sowie RNA-induzierte DNA-Methylierung (RdDM) oder transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) (Lisch 2009).

Eine hohe Transposonaktivität hat das Vorhandensein einer Vielzahl identischer Sequenzkopien zur Folge und damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Generierung eines RNA-Triggers, der zur Stilllegung der gesamten Transposonfamilie führt (Lisch 2009; Slotkin et al. 2005). Tandem-Duplikationen oder invertierte Duplikationen resultierend aus der Aktivität von Transposons können – vermittelt durch Antisense-Transkripte – ebenfalls Auslöser für eine Stilllegung sein (Slotkin et al. 2005). Obwohl Transpositionen im Allgemeinen innerhalb des Euchromatins erfolgen, liegt die Mehrheit der Transposons aufgrund der hoch effektiven Stilllegung im Wirtsgenom als Heterochromatin vor und ist sowohl transpositionell als auch transkriptionell inaktiv.

Trotzdem treten in natürlichen Populationen nachweislich regelmäßig Phasen erhöhter Transposon-induzierter Mutationsraten auf (Naito et al. 2006; Kalendar et al. 2000). Verschiedene Arten von biotischem und abiotischem Stress können nachweislich zur Reaktivierung stillgelegter Transposons führen (Ito 2012; Cavrak et al. 2014). Die zugrundeliegenden Prozesse sind jedoch ebenso unzureichend aufgeklärt wie der Mechanismus, der dazu führt, dass Transposons durch Hybridisierung – und einer damit verbundenen Änderung des Methylierungsmusters – reaktiviert werden können (Ungerer et al. 2006; Josefsson et al. 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Transposons Strategien entwickelt haben, ihre Stilllegung aktiv zu verhindern (Nosaka et al. 2012).

Von Transposons kodierte Gene könnten eine Rolle bei der Vermeidung bzw. Umkehrung der DNA-Methylierung spielen (Cui und Fedoroff 2002; Hashida et al. 2006). Außerdem könnte durch die für einige Familien charakteristische Aufnahme von Wirtsgensequenzen die spezifische Stilllegung behindert werden (Lisch 2009).

Die Folge von In- und Reaktivierung ist eine sich ständig verschiebende Balance zwischen aktiven und stillgelegten Transposons (Lisch 2013).

### Auswirkungen der Aktivität von Transposons

Transposons bilden einen signifikanten Anteil eukaryotischer Genome. Ihre Fähigkeit zur Transposition und Replikation sorgt für die Plastizität des Genoms (Wicker et al. 2007).

Trotz ihres in hohem Maße parasitären Charakters bewegen sich Transposons zwischen reinem Parasitismus und einem Gegenseitigkeitsverhältnis. Als dynamischste Komponente des Genoms stellen sie einen sich rapide entwickelnden Pool potentiell nützlicher Informationen dar. Aufgrund ihrer hoch mutagenen Eigenschaften sind sie für eine große Vielfalt an Veränderungen der Genexpression und -funktion in Pflanzen verantwortlich und besitzen ein hohes Potenzial für genetische Variation (Lisch 2013). Als einziges Mutagen sind sie dazu prädestiniert dem betroffenen Organismus Vorteile zu verschaffen, was einen möglichen Grund darstellt, warum sie regelmäßig domestiziert werden (Bennetzen und Wang 2014). Natürliche Selektion gegen negative Auswirkungen und spezielle Strategien sowohl von Transposon als auch von Wirt führen dazu, dass überdauernde Veränderungen neutral oder nur leicht schädlich wirken. Die Breite der daraus hervorgehenden potentiell nützlichen Variation lässt

vermuten, dass Transposons als endogenes Mutagen maßgeblich zur Evolution ihrer Wirte beigetragen haben (Lisch 2013).

Aufgrund ihrer Fähigkeit die Expression von Genen in ihrer Nähe zu verändern, wurden Transposons von ihrer Entdeckerin (McClintock 1948) ursprünglich „controlling elements“ genannt (McClintock 1956).

Die vermutlich am häufigsten detektierte Transposon-induzierte Regulation ist der Verlust der Funktion eines Gens. Durch von Transposons verursachte Insertionen oder Deletionen in oder in die Nähe einer für ein Gen kodierenden Sequenz können Null-Mutationen hervorgerufen werden (Doring und Starlinger 1986). Noch wahrscheinlicher sind Mutationen, die die Regulation von Genen beeinflussen. Die Insertion in regulatorische Abschnitte kann positive (Enhancer) oder negative (Repressor) Regulierungsfunktionen aufheben und zu einer dramatischen Veränderung des Phänotyps führen (Lisch 2013).

In einem Fall beim Mais sorgt die Transposition eines Miniature Inverted-repeat Transposable Elements (MITEs) in eine konservierte nicht-kodierende Sequenz (CNS) 70 kb upstream eines negativ regulierenden Transkriptionsfaktors zu einer Veränderung der Blütezeit (Salvi et al. 2007).

Ein weiteres Beispiel ist die Überexpression eines Gens infolge der Enhancer-Aktivität von *Hopscotch*, einem Retrotransposon ca. 60 kb upstream der Kodierungssequenz des besagten Gens (Studer et al. 2011).

Trotz bemerkenswerter Kompetenz der Wirtsorganismen zur Detektion von Transposons sind auch regelmäßig Wirtsgene von den Mechanismen zur Regulierung von Transposons betroffen. Infolge einer Vielzahl von möglichen Veränderungen der Gensequenz kann es zu Transposon-ähnlichen Abschnitten kommen, die dazu führen, dass betroffene Gene Transposon-spezifischen Regulierungsmechanismen unterworfen werden. In anderen Fällen werden mit Transposons in Verbindung stehende Wirtsgene durch epigenetische Stilllegung direkt reguliert (Lisch 2009). Die Entstehung von potentiell nützlichen Epiallelen, die sich in DNA- und Histonmodifizierung aber nicht in der Basenabfolge unterscheiden, kann die Folge sein. Variationen bei der Histon-Modifizierung und DNA-Methylierung bieten ein enormes Differenzierungs-Potential. Zwar können nicht alle Epiallele mit Transposons assoziiert werden, in den meisten Fällen teilen sie jedoch strukturelle Eigenschaften wie direkte oder invertierte Repeats (Lisch 2009).

Da Transposons im Allgemeinen eigene Regulationssequenzen besitzen, kann die Insertion in der Nähe eines Gens Veränderungen in der Regulation – wie zum Beispiel gewebespezifische Expression des betroffenen Gens – zur Folge haben (Kloeckener-Gruissem und Freeling 1995; Butelli et al. 2012). In vielen Pflanzenpromotoren finden sich Transposonfragmente, die die Genregulation beeinflussen können (White et al. 1994). Die Promotor-spezifische Insertion von *mPing* – einem Klasse II Transposon mit Stress-sensitivem Transkriptionsregulator – hat beim Reis dazu geführt, dass es bei Stress zu einer koordinierten Aktivierung mehrerer Gene kommt (Naito et al. 2009).

Eine weitere Folge der Aktivität von Transposons ist die „Zweckentfremdung“ von Transposasen bzw. die Entstehung neuer Genfunktionen. Der Prozess der „molekularen Domestikation“ beschreibt die Fusion eines Transposons oder einzelner Komponenten der enzymatischen Maschinerie mit der regulatorischen und/oder kodierenden Region eines Wirtsgens. Viele von Transposons abgeleitete Gene haben im Wirtsorganismus die Funktion von Transkriptionsfaktoren eingenommen (Lin et al. 2007; Sinzelle et al. 2009). Schätzungsweise mehr als 1,2 % der Protein-kodierenden Gene in *Arabidopsis* enthalten Transposon-assoziierte Protein-kodierende Segmente (Lockton und Gaut 2009).

Neben einer Vielzahl von Mechanismen zur Regulierung benachbarter Gene besitzen Transposons über *trans*-wirkende RNAs auch das Potential zur Regulierung nicht-benachbarter Gene. Aktiv transkribierte Transposons sind Quelle für kurze endogene RNAs, bei deren Abbau miRNAs oder siRNAs entstehen, welche das Potential besitzen, über teilweise Komplementarität Wirtsgene zu regulieren (Yan et al. 2011; McCue und Slotkin 2012; McCue et al. 2013). Einige auf Transposons zurückzuführende ncRNAs sind in der Lage, Proteine zu binden. Beispielsweise bindet eine von einem LTR-Retrotransposon transkribierte lncRNA Transkriptionsfaktoren. Andere RNA-Transkripte unterdrücken Proteinfunktionen (Hadjigryrou und Delihias 2013).

Ein häufiger Nebeneffekt der Transposition von Transposons der Klasse II – besonders von *Mutator*-like elements (MULEs) – ist die Aufnahme genomischer Sequenzen. Fragmente verschiedener chromosomaler Loci können dadurch zu neuen ORFs fusionieren und es kann zur Expression chimärer Transkripte kommen (Jiang et al. 2004). Aus der (z.T. gewebespezifischen) Transkription und alternativer Prozessierung können zahlreiche Produkte hervorgehen. Allerdings gibt es keinen Fall, in dem eines dieser Gene eine nachgewiesene Funktion erfüllt oder einem Aspekt der Pflanzenbiologie zugeordnet werden kann.

Schließlich kann ektopische Rekombination infolge von Transposonaktivität dazu führen, dass große, Gene enthaltende Fragmente von bis zu 50 kb transpositioniert werden oder ganze Abschnitte des Genoms bei ungleicher homologer Rekombination zwischen den LTRs von Retrotransposons verloren gehen (Gaut et al. 2007).

## 1.6 Zielsetzung

Bei der dem Kolumnarwachstum bei *Malus x domestica* zugrundeliegenden Mutation handelt es sich um eine replikative Transposition des Ty3/Gypsy-Retrotransposons *Gypsy-44* auf Chromosom 10 an Position 18,8 Mb. Die Ausprägung des kolumnaren Phänotyps korreliert mit der gewebespezifisch signifikant differenziellen Expression des direkt downstream von *Gypsy-44* benachbarteten Gens *dmr6-like* (*MdCo31*).

Das Ziel der Arbeit ist die Suche nach Hinweisen auf mögliche, dem Kolumnarwachstum zugrundeliegende, Signaltransduktionsketten bzw. Ursachen für die Überexpression des Gens *MdCo31*.

Mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer sollen zunächst transgene Linien von *Malus x domestica* und *Nicotiana tabacum* erzeugt werden.

Die Transformation normalwüchsiger Individuen von *Malus x domestica* mit verschiedenen Vektor-Konstrukten soll aufdecken, auf welche Weise die genetische Veränderung die Ausprägung des kolumnaren Phänotyps hervorruft.

Anhand transgener Linien von *Nicotiana tabacum* soll untersucht werden, ob die phänotypischen Merkmale des Kolumnarwuchses auch auf andere Arten übertragbar und die verantwortlichen Sequenzen funktionell konserviert sind.

Im Rahmen der Charakterisierung der transgenen Linien sollen sowohl Phänotyp als auch Genotyp analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Grundlegende Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.1.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolierung der DNA aus Pflanzengewebe (Blätter, Sprossspitzen, Sprosse) erfolgte nach modifiziertem Protokoll von Eimert et al. (2012).

Pflanzenmaterial (100 mg) wurde in 500 µl Harnstoff-Extraktions-Puffer (**Tabelle 28**) gegeben und nach Zugabe von 1 % unlöslichem Polyvinylpolypyrrolidon homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 400 µl Harnstoff-Extraktions-Puffer sowie 1 µl RNase [10 mg/ml] wurde bei 65 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde 10 min lang bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (**Kapitel 2.1.2**) unterzogen. Nach der Fällung der DNA (**Kapitel 2.1.3**) wurde in deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Mit dem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfolgte die Bestimmung der Reinheit bzw. die Messung der DNA-Konzentration

#### 2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die von Chomczynski und Sacchi (1987) abgeleitete Nukleinsäure-Extraktionsmethode dient der Abtrennung von Proteinen.

Zunächst wurden die Proben mit dem gleichen Volumen PCI (Phenol equilibriert, nicht stabilisiert : Chloroform : Isoamylalkohol 25 : 24 : 1 versetzt und gemischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurde die obere Nukleinsäure-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Optional können die genannten Schritte ein weiteres Mal wiederholt werden.

#### 2.1.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung ist eine Methode zur Reduzierung des Volumens sowie zur Entfernung von Salzurückständen und wird häufig als abschließender Aufreinigungsschritt durchgeführt. Die DNA/RNA wird bei hoher Salzkonzentration in Ethanol oder Isopropanol präzipitiert.

#### Methode 1: Fällung der DNA mithilfe von NaCl und Ethanol

Die Proben wurden mit einem halben Volumen NaCl [5 M] versetzt und gemischt. Nach Zugabe von zwei Volumen Ethanol absolut (oder alternativ einem Volumen Isopropanol) wurde erneut gemischt, 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und schließlich der Überstand verworfen. Anschließend wurde 1 ml Ethanol [70 %] zugegeben, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Abschließend wurden Ethanolrückstände in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur verdampft und die präzipitierte DNA/RNA resuspendiert.

#### Methode 2: Fällung der DNA mithilfe von Dialyse-Puffer und Ethanol

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Dialyse-Puffer [10 x] (**Tabelle 29**) versetzt und gemischt. Anschließend wurden zwei Volumen Ethanol, absolut zugegeben und erneut gemischt. Nach mindestens 2 h bei -20 °C wurde 30 min bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde 1 ml Ethanol [70 %] zugegeben und bei gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, Ethanolrückstände in einer Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur verdampft und die präzipitierte DNA/RNA resuspendiert.

### **2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren zur Amplifikation von DNA. In repetitiven Zyklen bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Extension werden spezifische Sequenzen mittels DNA-Polymerase vervielfältigt (Mullis et al. 1986).

Je nach Anforderung an die PCR wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet.

#### **2.1.4.1 Standard PCR**

Zu Beginn der Arbeiten wurde Taq DNA Polymerase (recombinant) der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) zum Nachweis der Anwesenheit transgener Sequenzen verwendet. Im späteren Verlauf wurde zur DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gewechselt.

Die Amplifikation von Sequenzen zur Klonierung oder zur Sequenzierung (rpPCR, iPCR) erfolgte mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit Proof-reading Aktivität.

Die TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) fand bei der Amplifikation von sehr langen Sequenzen für die Klonierung Verwendung. Sie besitzt Exonuklease-Aktivität und ist optimiert auf „long range“ PCRs.

Wann immer möglich wurde mit Mastermixen gearbeitet.

### 2.1.4.2 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

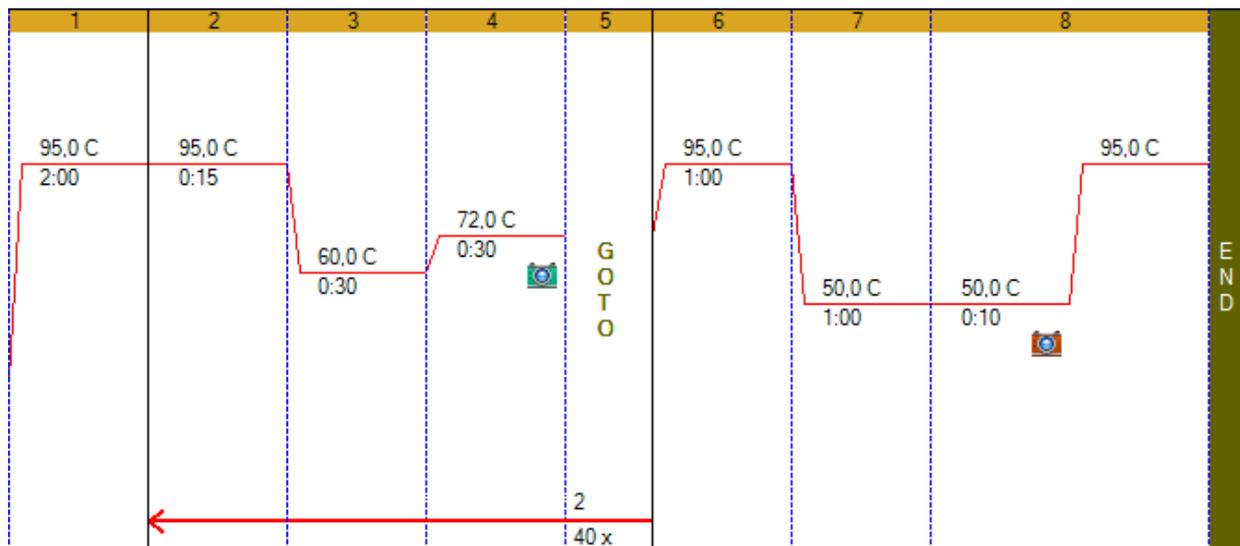
Die quantitative Real Time PCR (qPCR) basiert auf dem gleichen Prinzip wie die Standard PCR. Die Quantifizierung der DNA erfolgt jedoch in Echtzeit während des Laufs. Mittels qPCR lassen sich unter anderem Genexpressionsanalysen zur Messung der Transkriptionsaktivität von Genen durchführen.

Von in der Entwicklung befindlichen Blättern (*Nicotiana tabacum*) bzw. Sprossspitzen (*Malus x domestica*) wurde zunächst mit dem innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) RNA isoliert (**Kapitel 2.1.8**). Zusätzlich zur direkten DNase I-Verdauung auf der Säule mittels innuPREP DNase I Digest Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) wurde im Anschluss an die Isolation eine weitere DNase-Verdauung mit DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien) wurde anschließend 1 µg RNA in einem 20 µl Ansatz in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der Reaktionsansatz zunächst bei 25 °C für 10 min, dann für 120 min bei 37 °C und schließlich für 300 min bei 85 °C inkubiert. Terminiert wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C.

Die Durchführung der Realtime PCR-Reaktionen erfolgte am CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System von BioRad (Hercules, USA) in Verbindung mit dem SYBR® Select Master Mix for CFX (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien).

2 µg RNA wurden zunächst einer DNase-Verdauung unterzogen und anschließend in einer 40 µl Reaktion mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

Bei der folgenden Realtime PCR mit einem Reaktionsvolumen von je 10 µl wurden 2 µl der 1:8 (*Malus x domestica*) bzw. 1:200 (*Nicotiana tabacum*) verdünnten cDNA eingesetzt. Der Ablauf der Reaktion ist auf **Abbildung 2** einzusehen.



**Abbildung 2:** Graphische Darstellung des Ablaufs der qPCR

Die Erstellung der Standardkurven erfolgte mit zwei technischen Replikaten und einer Verdünnungsreihe der cDNA von 1:5 bzw. 1:2 (Primerpaar „MdCo31“ bei *Malus x domestica*). Die Auswertung erfolgte auf Grundlage von zwei (*Nicotiana tabacum*) bzw. drei (*Malus x domestica*) technischen Replikaten. Eine spezifische Amplifikation wurde durch No-template-Kontrollen und Schmelzkurven-Analysen verifiziert.

Zur Normalisierung der Expression der Zielgene bei *Malus x domestica* wurden die zuvor bereits von Wolters (2014) als „stabil exprimiert“ verifizierten Referenzgene *Actin* (Li und Yuan 2008) und *Md\_4592:1:a* (Botton et al. 2011) verwendet. Die Expression des Zielgens bei *Nicotiana tabacum* wurde mit den Referenzgenen *Ntubc2* und *EF-1alpha* (Schmidt und Delaney 2010) normalisiert.

Die Berechnung der Ct-Werte erfolgte durch die Bio-Rad CFX Manager-Software.

Zur Analyse der Daten wurde die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode (Pfaffl 2001) verwendet. Anhand von Standardkurven wurde die Effizienz aller verwendeten Primerpaare bestimmt und bei der Auswertung berücksichtigt.

### 2.1.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe im Anschluss einer PCR oder einer Restriktionsverdauung.

Zum Einsatz kamen insgesamt vier verschiedene Elektrophoresesysteme.

Abhängig von der benötigten Größe des Gels kamen die drei horizontalen Systeme oder zur Überprüfung der Qualität der RNA die vertikale GENTERphorese™-Kammer der Fa. GENTERprise (Mainz, Deutschland) zum Einsatz. Für die Auftrennung von DNA wurde TBE-Puffer [1x] (**Tabelle 30**) und MOPS-Puffer [1x] (**Tabelle 31**) für RNA als Laufpuffer verwendet. Als Molekulargewichtsstandard diente der GeneRuler 1 kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Stop-Puffer (**Tabelle 32**) versetzt. RNA-Proben wurde 2x RNA Loading Dye von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) zugesetzt. Den Agarosegelen wurde entweder Roti-Gel Stain (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben oder die Gele im Anschluss an die Elektrophorese 10 min in Ethidiumbromid-Lösung [0,0001 %] inkubiert und anschließend für 10 min in dH<sub>2</sub>O „gewaschen“. Die Dokumentation des Gels unter UV-Licht erfolgte mit dem MF-ChemiBIS 3.2 von DNR Bio-Imaging Systems (Jerusalem, Israel).

### 2.1.6 Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Bestrahlung des Agarosegels mit UV-Licht zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs schädigt die DNA (Becker und Wang 1989). Dieser Schritt ist daher bei der Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen kritisch. Der schädigende Effekt der UV-Strahlung wird durch Zugabe von Guanosin reduziert (Gründemann und Schömig 1996). Deshalb wurde bei Durchführung von Elektrophoresen mit anschließender Rückgewinnung von DNA-Fragmenten TBE-Puffer mit Zusatz von 283 g/l Guanosin sowohl zum Ansetzen der 0,8 bzw. 1,0%igen Agarosegele als auch als Laufpuffer verwendet.

#### Methode 1: Mittels Elektroelution

Die Wiedergewinnung von Fragmenten mit einer Größe von über 10.000 bp erfolgte durch Elektroelution.

Hierzu wurden die Fragmente im Anschluss an eine Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgeschnitten und in ca. 5 cm lange Dialyseschläuche MWCO: 6.000 bis 8.000 (Spectrum Laboratories Inc., Los Angeles, USA) gegeben. Nach Zugabe von 0,5 ml TBE-Puffer wurden die Schläuche luftblasenfrei mit einem Clip verschlossen und senkrecht zur Spannungsrichtung in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Für 0,5 bis 2 h wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Zum Abschluss wurde die Spannungsrichtung für drei Minuten umgekehrt. Der Puffer aus den Dialyseschläuchen wurde in Reaktionsgefäße überführt, der Dialyseschlauch mit 200 µl TBE-Puffer nachgespült und schließlich beide Lösungen vereint.

#### Methode 2: Mittels Kit

Fragmente mit einer Größe von maximal 10.000 bp wurden mittels Ultrafree-DA Gel Extraktion Kit (Merk Millipore, Billerica, Massachusetts) zurückgewonnen.

Die Fragmente wurden nach Durchführung einer Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgeschnitten und nach Herstellerangaben zurückgewonnen.

### **2.1.7 Sequenzierung von DNA-Sequenzen**

Reaktionen für Sequenzierungen wurden gemäß den Vorgaben der durchführenden Firma StarSEQ (Mainz, Deutschland) angesetzt.

### **2.1.8 RNA-Isolation**

Pflanzenmaterial zur Isolation von RNA wurde unmittelbar nach der Ernte in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Die Extraktion erfolgte mittels innuPREP Plant RNA Kit der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) und wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Mit Hilfe des innuPREP DNase I Digest Kits (Analytik Jena, Jena, Deutschland) erfolgte eine direkte DNase I-Verdauung auf der Säule. Anschließend erfolgte eine weitere DNase-Verdauung mit DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Mittels NanoDrop 1000 Spektralphotometer wurde die Konzentration der Proben bestimmt. Zur anschließenden Qualitätsprüfung der isolierten RNA wurde die vertikale

GENTerphorese™-Kammer der Fa. GENTerprise (Mainz, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1,2%igen Formaldehyd-Gelen (**Tabelle 33**). Es wurden jeweils 0,2 bis 1 µg RNA gemäß Herstellerangaben mit 2x RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt, 10 min bei 70 °C erhitzt, auf Eis heruntergekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 45 min bei einer Spannung von 80 V. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer (**Tabelle 31**) [1x] (mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt) verwendet. Im Anschluss wurde das Gel 10 min in Ethidium-bromid-Lösung [0,0001 %] inkubiert und schließlich unter UV-Licht dokumentiert.

### 2.1.9 Reverse Transkription

Zur Synthetisierung einzelsträngiger cDNA wurde die isolierte RNA einer reversen Transkription mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Herstellerangaben unterzogen

### 2.1.10 Restriktion von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Falls nicht anders beschrieben, erfolgte die enzymatische Verdauung über Nacht.

### 2.1.11 Plasmid-Ligation und Transformation von *Escherichia coli*

Die durchgeführten Ligationen erfolgten mit T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Vorgaben des Herstellers bei 8 °C über Nacht. Bevor die Ligationsansätze zur Transformation von chemisch-kompetenten NEB 5-alpha *E. coli* (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerprotokoll verwendet wurden, erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung. Die hervorgegangenen Einzelkolonien wurden zum Animpfen von Über-Nacht-Kulturen verwendet. Zur Verifizierung der erfolgreichen Ligation folgten eine Plasmidpräparation mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sowie eine Restriktionsverdauung. Anhand des Bandenmusters der anschließenden Gelelektrophorese ließ sich ableiten, welche *E.*

*coli*-Kolonien einen erfolgreich klonierten Vektor enthielten. Diese wurden in Glycerinkulturen überführt.

### **2.1.12 Herstellung von kompetenten Zellen und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach Protokoll von Wise et al. (2006).

Zunächst wurden 5 ml mit Rifampicin [50 mg/l] versetztes YEP-Medium (**Tabelle 52**) mit dem zu transformierenden *Agrobacterium*-Stamm (**Tabelle 1**) angeimpft und über Nacht bei 250 rpm und 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Über-Nacht-Kultur zum Animpfen von 50 ml YEP-Medium verwendet. Nachdem die Bakterienkultur eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 1,0 erreicht hatte, wurde 10 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 5 ml eisgekühltem CaCl<sub>2</sub> [20 mM] resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 1 ml eisgekühltem CaCl<sub>2</sub> [20 mM] wurden je 150 µl der Suspension in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Aufbewahrung bei -80 °C.

Die chemische Transformation von *A. tumefaciens* wurde nach der Freeze-Thaw-Methode (Wise et al. 2006) durchgeführt.

Kompetenten Zellen wurde vor dem Auftauen 1 µg Plasmid-DNA zugegeben. Nach dem Auftauen wurde das Reaktionsgefäß für 5 min in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei Zimmertemperatur erneut aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 2 ml YEP-Medium übertragen und 2 bis 4 h bei 250 rpm und 28 °C inkubiert. Schließlich wurde 2 min bei 10.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Kanamycin-haltigem YEP-Medium resuspendiert. 100 µl bzw. 300 µl der Suspension wurden zum Animpfen von YM-Platten mit Zusatz von Rifampicin [50 mg/l] verwendet. Nach drei Tagen wurden die gewachsenen Einzelkolonien zum Animpfen von Über-Nacht-Kulturen verwendet. Um zu verifizieren, dass die Transformation mit dem gewünschten Plasmid erfolgt ist, wurde nach Durchführung einer Plasmidpräparation (**Kapitel 2.1.13**) eine Restriktionsverdauung mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Bakteriensuspensionen, die Plasmide enthielten, die das zu erwartende Bandenmuster aufwiesen, wurden für die Herstellung von Glycerinstammkulturen verwendet.

### 2.1.13 Plasmidpräparation

Bei der Plasmidpräparation wurde die Methode dem Anspruch an Quantität und Qualität angepasst.

#### Methode 1

Die Isolierung von kleineren Mengen hochqualitativer Plasmid-DNA erfolgte mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerprotokoll.

Zur Isolierung aus *A. tumefaciens* wurde das Protokoll modifiziert. Agrobakterien-Kulturen wurden drei Tage bei 28 °C und 250 rpm inkubiert und anschließend bei 2.700 g für 15 min zentrifugiert. Nach der Resuspension wurden 20 µl Lysozym [50 mg/ml] zugegeben und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dauer der Zentrifugation nach Zugabe der Neutralisations-Lösung wurde auf 10 min erhöht. Die folgenden Schritte erfolgten gemäß Herstellerprotokoll. Letztlich wurde in 35 µl Elution-Puffer eluiert.

#### Methode 2

Für die Gewinnung von größeren Mengen transfection-grade Plasmid-DNA wurde das NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit von Macherey-Nagel (Weilmünster, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

#### Methode 3

Die Präparation nach einem am Whitehead Institute (Massachusetts, USA) entwickelten Protokoll lieferte sehr große Mengen Plasmid-DNA.

Zunächst wurde eine 5 ml Über-Tag-Kultur angeimpft. Diese wurde verwendet, um 500 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium anzuimpfen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 220 rpm für 16 bis 18 h. Im Anschluss wurde die Bakterienkultur bei 4 °C und 3.000 g für 15 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Bakterienpellet in 10 ml Lösung I (**Tabelle 39**) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten die Zugabe von 20 ml Lösung II (**Tabelle 39**) und gründliches, sanftes Schütteln. Nach zehnmütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 15 ml eisgekühlte Lösung III (**Tabelle 39**) zugegeben, erneut sanft geschüttelt, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich bei 4 °C und 12.000 rpm (9,5 g) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues Zentrifugengefäß

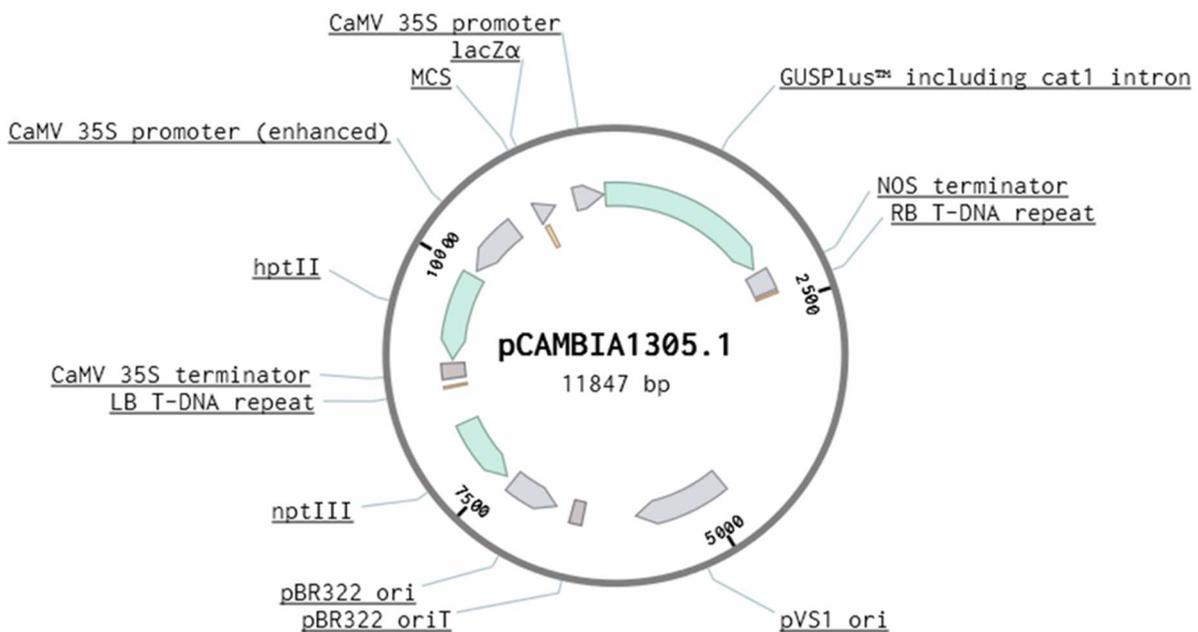
übertragen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils 15 ml Isopropanol (-20 °C) für eine Isopropanol-Fällung zugegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit bei -20 °C wurde für 20 min bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und in je 3 ml TE-Puffer (**Tabelle 39**) resuspendiert. Danach wurden je 1,5 ml Kaliumacetat [7,5 M] zugegeben, gründlich gemischt, der Inhalt der Zentrifugenröhrchen vereint und mindestens 45 min bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur und 3.000 g für 20 min wurde der Überstand einer Ethanol-Fällung (**Kapitel 2.1.3**) unterzogen. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 700 µl 50T/50E-Puffer (**Tabelle 39**) resuspendiert und einer 45-minütigen RNase-Verdauung bei 37 °C mit 2 µl RNase A [10 mg/ml] unterzogen. Nach Durchführung einer Phenol-Chloroform-Extraktion (**Kapitel 2.1.2**) erfolgte eine Isopropanolfällung, die mit der Resuspension des Pellets in 200 µl dH<sub>2</sub>O endete.

## 2.2 Gentechnische Transformation

### 2.2.1 Klonierung der Transformationsvektoren

Die zur Transformation von *Malus x domestica* verwendeten Transformationsvektoren basieren auf dem Vektor pCAMBIA1305.1 (pCambia vectors) (**Abbildung 3**) bzw. dem Vektorsystem pART7/pART27 (Gleave 1992) (**Abbildung 4**).

#### 2.2.1.1 pCAMBIA 1305.1



**Abbildung 3: Binärer Vektor, pCAMBIA1305.1 (pCambia vectors)**

Die wichtigsten Features sind dargestellt: Die rechte (RB T-DNA repeat) und linke Bordersequenz (LB T-DNA repeat) flankieren die T-DNA, die das Selektionsgen *hptII*, welches für Hygromycin Phosphotransferase kodiert, in Kombination mit dem Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter mit duplizierter Enhancer-Sequenz (CaMV 35S promoter (enhanced)) und dem 35S Terminator enthält. Außerdem enthält die T-DNA das *GUSPlus*<sup>TM</sup>-Reportergen, welches die Durchführung eines GUS-Tests ermöglicht. Zur bakteriellen Selektion ist das Gen *nptIII*, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, vorhanden. Das Gen *lacZα* enthält die Multiple Cloning Site (MCS) und ermöglicht die Blau-Weiß-Selektion. Außerdem sind die ORI-Sequenzen, welche eine Replikation in *E. coli* (pBR322 ori) bzw. *A. tumefaciens* (pVS1 ori) sowie die Konjugation (pBR322 oriT) ermöglichen, vorhanden.

- pCAMBIA 1305.1 + Gypsy-44

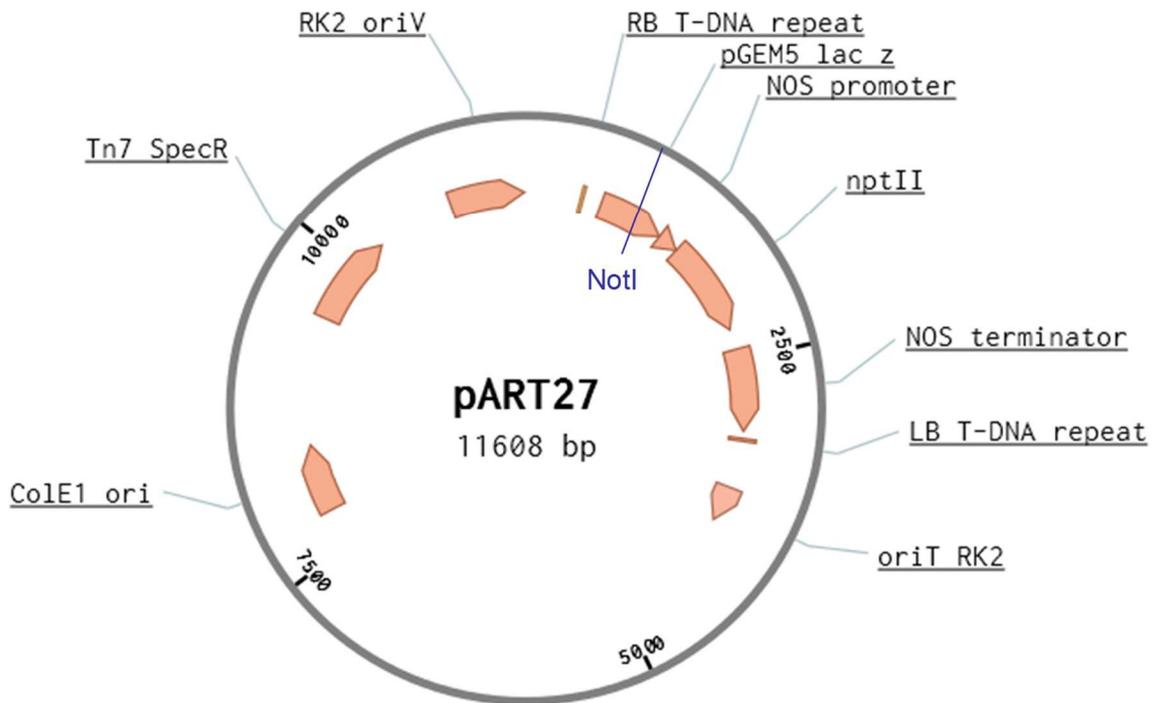
Zur Konstruktion des Vektors wurde zunächst das Plasmid pCambia1305.1 einer Restriktionsverdauung mit *Ecl136II* mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung unterzogen. Die folgende Dephosphorylierung mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase verhindert eine Rezirkularisierung des Plasmids.

Zeitgleich wurde der Bac-Klon I2\_3 (Otto 2013) mittels Plasmidpräparation nach einem am Whitehead Institute (Cambridge, Massachusetts) entwickelten Protokoll (**Kapitel 2.1.13 Methode 3**) isoliert. 30 µg des Plasmids wurden doppelt verdaut; Aufgrund der Inkompatibilität der Reaktionspuffer der Restriktionsenzyme musste nach der ersten Verdauung mit *BglII* zunächst eine Phenol-Chloroform-Extraktion (**Kapitel 2.1.2**) mit anschließender Fällung (**Kapitel 2.1.3**) durchgeführt werden. Im Anschluss erfolgte die zweite Verdauung mit *Eco147I*. Die folgende Gelelektrophorese mit anschließender Rückgewinnung aus dem Gel mittels Elektroelution diente der Isolation des 8334 bp großen Fragments, welches das Transposon *Gypsy-44* enthält. Anschließend folgte das Blunting des Restriktions-Fragments und die Ligation mit dem linearisierten und dephosphorelierten Vektor pCambia1305.1 mittels „DNA Blunting and Ligation Kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von *E. coli* (**Kapitel 2.1.11**) und schließlich *A. tumefaciens* (**Kapitel 2.1.12**) verwendet.

- pCAMBIA 1305.1 + Gypsy-33/44

Der Bac-Klon K2\_3 (Otto 2013) diente als Template für eine long-range PCR (**Kapitel 2.1.4.1**) zur Amplifikation des Retrotransposons *Gypsy-33* mit inseriertem *Gypsy-44* (12.209 bp). Die verwendeten Primer besaßen einen Überhang mit *Acc65I*- bzw. *SalI*-Schnittstelle. Sowohl der PCR-Ansatz als auch der Vektor pCambia1305.1 wurden einer Restriktionsverdauung mit den Enzymen *Acc65I* und *SalI* unterzogen. Nach Durchführung einer Gelelektrophorese mit Rückgewinnung aus dem Gel folgte die Ligation und schließlich die Transformation in *E. coli* (**Kapitel 2.1.11**) und *A. tumefaciens* (**Kapitel 2.1.12**).

### 2.2.1.2 pART7/pART27 Vektorsystem



**Abbildung 4: Binärer Vektor, pART27 (Gleave 1992)**

Die wichtigsten Features sind dargestellt: Die rechte (RB T-DNA repeat) und linke Bordersequenz (LB T-DNA repeat) flankieren die T-DNA, die das Selektionsgen *nptII*, welches für Neomycin Phosphotransferase kodiert, in Kombination mit dem Nopalinsynthase-Promotor (NOS promoter) und -Terminator (NOS terminator) enthält. Zur bakteriellen Selektion ist das Tn7-Gen *aadA*, welches Spectinomycin- bzw. Streptomycin-Resistenz verleiht, vorhanden. Das lacZ-Gen (*lac z*) aus pGEM5 ermöglicht die Durchführung einer Blau-Weiß-Selektion. Außerdem sind die ORI-Sequenzen zur Replikation in *E. coli* (ColE1 ori) bzw. *A. tumefaciens* (RK2 oriV) sowie zur Konjugation (oriT RK2) vorhanden.

- pART27/10

Die T-DNA des Vektors enthält das Reportergen *GUS\_Int* sowie das Selektionsgen *nptII*.

- pART27 + Gy44

Zur Konstruktion des Vektors musste zunächst das Transposon *Gypsy-44* isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde der Bac-Klon I2\_3 einer Restriktionsverdauung mit den Enzymen *BglII* und *Eco147I* (siehe oben: „pCAMBIA 1305.1 + *Gypsy-44*“) unterzogen. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und das

entsprechende Fragment aus dem Gel zurückgewonnen. Es folgten die Behandlung mit T4 DNA Polymerase zur Generierung von „blunt ends“ und A-Tailing mit Taq-Polymerase gemäß Herstellerangaben. Nach der Ligation mit pGEM T-easy (Promega, Madison, Wisconsin) erfolgte die Transformation in *E. coli* (**Kapitel 2.1.11**). Das erfolgreich ligierte Plasmid und der Vektor pART27 wurden daraufhin einer Restriktionsverdauung mit *NotI* unterzogen und ligiert. Im Anschluss folgte die erneute Transformation in *E. coli* (**Kapitel: 2.1.11**) und schließlich *A. tumefaciens* (**Kapitel 2.1.12**).

- pART27 + MdCo31\_Sense

Zunächst wurden Primer zur Amplifikation des Gens *MdCo31* designt. Die Primer enthielten jeweils einen Überhang, auf dem die Sequenz der Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI* bzw. *Acc65I* enthalten war. Der Bac-Klon K2\_3 diente als Template für die Durchführung einer PCR mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Im Anschluss wurden das PCR-Produkt sowie der Vektor pART7 einer Restriktionsverdauung mit den Enzymen *Acc65I* und *EcoRI* unterzogen und miteinander ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* (**Kapitel 2.1.11**) wurde mit dem Enzym *NotI* restringiert und das erhaltene Plasmid mit dem Vektor pART27 ligiert. Es folgte die Transformation in *E. coli* und nach anschließender Sequenzierung in *A. tumefaciens* (**Kapitel 2.1.12**).

- pART27 + MdCo31\_Antisense

Die Vorgehensweise entsprach dem Ablauf zur Klonierung des Vektors „pART27 + MdCo31\_Sense“, jedoch waren die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen auf dem Überhang der zur Amplifikation verwendeten Primer vertauscht.

- pART27 + Gy44\_ORF\_Sense

Als erstes wurden Primer zur Amplifikation des größten (609 bp) Open-Reading-Frames (ORFs) des Transposons *Gypsy-44* designt. Die Primer enthielten jeweils einen Überhang, auf dem die Sequenz der Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoRI* bzw. *Acc65I* enthalten war. Die folgenden Arbeitsschritte entsprachen dem Ablauf zur Klonierung des Vektors „pART27 + MdCo31\_Sense“.

- pART27 + Gy44\_ORF\_Antisense

Die Konstruktion des Vektors war identisch mit dem Ablauf zur Klonierung des Vektors „pART27 + Gy44\_ORF\_Sense“, jedoch waren die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen auf dem Überhang der zur Amplifikation verwendeten Primer vertauscht.

### 2.2.2 Verwendete Agrobakterienstämme

Bei den zur Transformation verwendeten Agrobakterienstämmen handelte es sich um EHA105 bzw. LBA4404 (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Agrobakterienstämme**

Agrobakterien-Stamm	Chromosomale Herkunft	Abstammung Ti-Plasmid	Bakterielle Resistenz	Referenz
EHA105	C58	pTiBo542	Rifampicin	Hood et al. 1993 (1993)
LBA4404	Ach5	pTiAch5	Rifampicin	Ooms et al. 1982

### 2.2.3 Herstellung der zur Transformation verwendeten Bakteriensuspension

Zunächst wurde eine Petrischale mit verfestigtem YM-Medium (**Tabelle 51**) mit der zur Transformation zu verwendenden Agrobakterien-Glycerinkultur angeimpft, bei 28 °C für drei bis vier Tage inkubiert und schließlich bei 8 °C gelagert. Anschließend wurde mit einer Impföse Bakterienmaterial entnommen und 5 ml flüssiges YEP-Medium (**Tabelle 52**) angeimpft. Nach 16 h Inkubation bei 250 rpm und 28 °C wurden 1 bis 2 ml der Über-Nacht-Kultur (Ü/N-Kultur) zum Animpfen von 10 ml YEP-Medium verwendet. Die erneute Inkubation dauerte an bis die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) einen Wert von 1,6 bis 1,8 ergab. Die Messung erfolgte mit dem BioPhotometer der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde die Bakterienlösung bei 2.700 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in dH<sub>2</sub>O resuspendiert, auf einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,65 bis 0,7 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

## 2.2.4 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Malus x domestica*

Bei dem zur Transformation von *Malus x domestica* verwendeten Protokoll handelt es sich um die Modifikation des Protokolls von Yao et al. (2013).

### 2.2.4.1 Verwendete Transformationsvektoren

Bei der Transformation von *Malus x domestica* kamen alle in **Kapitel 2.2.1** beschriebenen Vektoren zum Einsatz.

### 2.2.4.2 Verwendete *Agrobacterium*-Stämme

Die Durchführung *Agrobacterium*-vermittelter Transformationen erfolgte sowohl mit dem Bakterienstamm EHA105 als auch mit LBA4404.

### 2.2.4.3 Verwendetes Pflanzenmaterial

Bei dem zur Transformation verwendeten Pflanzenmaterial handelte es sich um *in vitro*-Kulturen der kolumnar-wüchsigen Apfelsorte 'Procats 28' (Procats) und der normal-wüchsigen Sorte 'Royal Gala' bzw. des normal-wüchsigen Klons 'A14-190-93' (A14).

Die Kultur erfolgte bei einer Temperatur von 22 °C und täglich 16 h Licht mit einer Intensität von 65  $\mu\text{E} / (\text{s} * \text{m}^2)$ .

Zum Erhalt transformations- und regenerationsfähiger Blätter wurden die Pflanzen in Intervallen von vier Wochen auf verschiedenen Medien und in unterschiedlichen Kulturgefäßen kultiviert.

Die Erhaltungskultur erfolgte in 200 ml Gewebekultur-Gläsern auf Medium #5 (**Tabelle 44**) bzw. Medium #5 Pc (**Tabelle 45**). In vierwöchigen Intervallen wurden Sprossspitzen „geerntet“. Dabei wurde ein Teil der Sprossspitzen erneut auf Medium #5, die übrigen auf Medium HA1 (**Tabelle 46**) umgesetzt.

Nach vier Wochen auf Medium HA1 wurden die ältesten Blätter entfernt und die Sprosse für weitere vier Wochen auf Medium HA2 (**Tabelle 47**) in Sterivent Kulturgefäßen (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V., Haarlem, Niederlande) übertragen.

Für die Transformation wurden die jüngsten voll entfalteten Blätter verwendet.

Die Blätter wurden transversal in 2 mm breite Streifen und je nach Blattbreite zusätzlich in Längsrichtung geschnitten. Die Blattstiele und -spitzen wurden entfernt.

#### 2.2.4.4 Infektion

Nach dem Schneiden wurden die Blattstücke für 10 min bei gelegentlichem Schütteln in 20 ml der vorbereiteten Bakteriensuspension (**Kapitel 2.2.3**) gegeben. Anschließend wurden die Blattstücke auf zwei Lagen sterilem Filterpapier kurz abgetupft und auf Petrischalen mit Regenerationsmedium #53 (**Tabelle 48**) verteilt. Die Kokultur erfolgte bei 22 °C in absoluter Dunkelheit.

#### 2.2.4.5 Waschen und Beginn der Selektion

Drei bis vier Tage nach der Infektion wurden die Explantate in Zentrifugenröhrchen mit 20 ml dH<sub>2</sub>O gesammelt und für kurze Zeit stark geschüttelt. Danach wurde die Lösung sofort wieder abgegossen und die Blattstücke auf zwei Lagen Filterpapier übertragen. Schließlich wurden die Explantate auf Medium #53 mit Zusatz der entsprechenden zur Selektion geeigneten Antibiotika sowie 100 mg/l Cefotaxim (#53 HC bzw. KC) (**Tabelle 48**) verteilt. Die Selektion erfolgte bei 22 °C in absoluter Dunkelheit.

#### 2.2.4.6 Umsetzen

In Intervallen von drei bis vier Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium umgesetzt. In der Regel konnte nach zwei bis drei Wochen Kalluswachstum beobachtet werden.

Wenn die Blattstücke begannen sich braun zu verfärben und/oder sich Nekrosen bildeten, wurde der regenerierte Kallus abgeerntet und auf frischem Medium weiterkultiviert. Mit zunehmender Kulturdauer begannen einzelne Kalli abzusterben; daraufhin oder nach spätestens sieben Monaten in Kultur wurden sie verworfen.

Regenerierte Sprosse wurden nach Ausbildung mehrere Blätter mitsamt einem Teil des Blattes bzw. des Kallus' in Sterivent Low Container übertragen. Die Kultur erfolgte auf Erhaltungsmedium #5 mit Zusatz von 100 mg/l Cefotaxim sowie dem zur Selektion geeigneten Antibiotikum (#5 HC/KC) (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). Sprosse, die aus demselben Kallus hervorgegangen waren, wurden in Gruppen kultiviert. Die Sprosse wurden langsam an die Lichtverhältnisse adaptiert und schließlich unter vollem Licht (65 µE / (s \* m<sup>2</sup>)) kultiviert. In Intervallen von vier bis fünf Wochen wurden die Sprosse auf frisches Medium umgesetzt.

### **2.2.4.7 Pfropfung**

Nachdem sich die Sprosse zu kräftigen Pflänzchen entwickelt hatten und anfangen neue Triebe zu bilden, wurden sie auf einjährige Apfelunterlagen der Sorte 'Malling-Merton 111' ('MM 111') gepfropft und im Gewächshaus weiterkultiviert. Die Pfropfung – eine Form des seitlichen Spaltpropfens – erfolgte nach angepasstem Protokoll von Espley et al. (2013).

Bei einem jungen, stark austreibenden Trieb der Unterlage wurde ein 1 cm langer seitlicher Schnitt bis ins Kambium vorgenommen. In die Schnittstelle wurde ein circa 3 cm langer transgener Spross, der mit zwei Schnitten auf einer Länge von 1 cm keilförmig zugeschnitten wurde, gesteckt. Die Pfropfstelle wurde anschließend mit mehreren Lagen Parafilm umwickelt und mit einem Polyethylen-Beutel umschlossen. Nach zwei Wochen wurde der Beutel wieder entfernt und der Haupttrieb der Unterlage direkt oberhalb des Edelreises zurückgeschnitten. Eine weitere Woche später wurde der Parafilm eingeschnitten um ein Einwachsen zu verhindern.

## **2.2.5 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Nicotiana tabacum***

### **2.2.5.1 Verwendete Transformationsvektoren**

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Linien von *Nicotiana tabacum* wurden mit den folgenden Vektoren erzeugt:

- pART27/10
- pART27 + MdCo31\_Sense
- pART27 + Gy44\_ORF\_Sense

### **2.2.5.2 Verwendeter *Agrobacterium*-Stamm**

Zur Transformation wurde der Bakterienstamm LBA4404 (**Tabelle 1**) verwendet.

### **2.2.5.3 Verwendetes Pflanzenmaterial**

Bei dem verwendeten Pflanzenmaterial handelte es sich um in-vitro kultivierte Sprossspitzenkulturen von *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana. Die Kultur erfolgte auf einem auf MS-Medium basierenden Erhaltungsmedium (**Tabelle 49**). Zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation wurden die obersten drei bis vier voll entfalteten Blätter von vier bis sechs Wochen alten Sprossspitzen verwendet.

### **2.2.5.4 Infektion**

Nach der Ernte der Blätter wurde zunächst der Interkostalbereich entfernt. Anschließend wurden Blattstücke mit einer Kantenlänge von circa 3 mm geschnitten, in einer Schale mit dH<sub>2</sub>O gesammelt und in die vorbereitete Bakteriensuspension (**Kapitel 2.2.3**) gegeben. Die Blattexplantate wurden für 10 min bei Raumtemperatur und gelegentlichem, leichtem Schütteln inkubiert, im Anschluß auf Filterpapier abgetupft und schließlich auf Regenerationsmedium (**Tabelle 50**) ausgelegt. Die Kultur erfolgt bei 22 °C in Dunkelheit.

### 2.2.5.5 Waschen, Selektion und Kultur im Gewächshaus

Nach zwei bis drei Tagen Kokultur wurden die Blattexplantate in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit sterilem dH<sub>2</sub>O gesammelt und 15 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln „gewaschen“. Anschließend wurde das Wasser ausgetauscht und die Prozedur noch zweimal wiederholt. Beim dritten Waschen wurde dem Wasser 300 mg/l Ticarcillin zugegeben. Die Blattstücke wurden auf Filterpapier gesammelt und schließlich mit der abaxialen Seite nach oben auf Selektionsmedium (**Tabelle 50**) übertragen. Die Petrischalen wurden mit Frischhaltefolie verschlossen und die Explantate bei 22 °C im Dunklen kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgte die Kultur bei einer Photoperiode von 16 h Licht (65 µE / (s \* m<sup>2</sup>)) und 8 h Dunkelheit. Alle vier Wochen wurden die Explantate auf frisches Selektionsmedium gesetzt. Beim Umsetzen wurden Sprossregenerate entfernt und in Gewebekulturgläsern (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) unter Selektionsbedingungen weiterkultiviert. Sprosse, die sich zu kräftigen Pflänzchen entwickelt hatten, wurden in Erde übertragen und bis zur Blüte im Gewächshaus kultiviert. Durch Eintüten der Blüten wurde Fremdbestäubung verhindert. Samenkapseln mit reifen Samen wurden abgeerntet.

### 2.2.5.6 Aussaat der aus Selbstung hervorgegangenen Samen

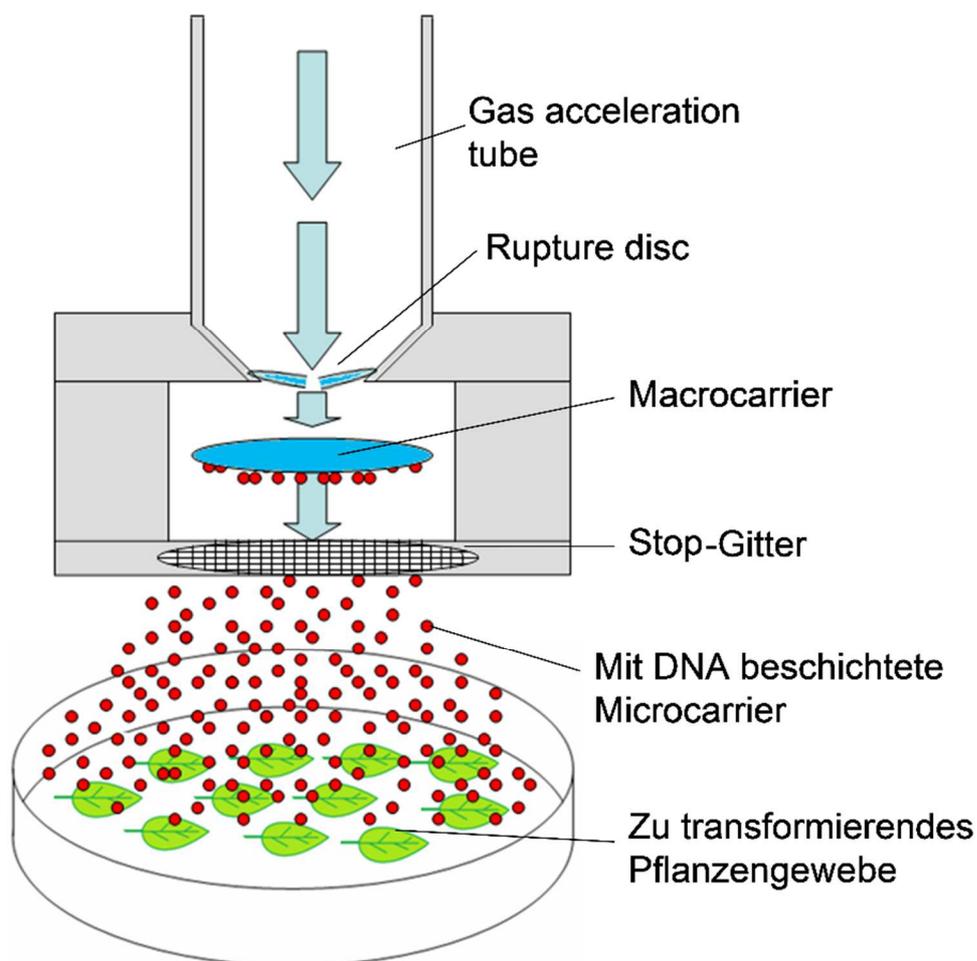
Nach der Ernte wurden die aus Selbstung der transgenen Linien hervorgegangenen Samen von Pflanzenresten getrennt und 2 min in 2%igem Ethanol oberflächensterilisiert. Nach dem Absaugen des Ethanols wurde dH<sub>2</sub>O zugegeben und nach gründlichem Schütteln wieder entfernt. Anschließend folgte 10-minütiges Schütteln in 1:4 verdünnter Natriumhypochloridlösung [12 % Cl, techn.] versetzt mit wenigen Tropfen Tween20. Nach erneuter drei- bis sechsmaliger Zugabe von dH<sub>2</sub>O und kräftigem Schütteln wurden die Samen in 0,1%iger Agaroselösung resuspendiert und mit einer Pipette auf zwei Petrischalen mit Kanamycin-haltigem MS-Medium (**Tabelle 49**) übertragen. Durch die Zugabe von Kanamycin wurde sichergestellt, dass nur Samen, die auf mindestens einem Chromosomensatz die bei der Transformation der elterlichen Pflanze übertragene T-DNA enthalten, sich zu kräftigen Sämlingen entwickeln. Nach 48-stündiger Lagerung bei 8 °C im Dunkeln erfolgte die Kultur bei 22 °C unter Licht. Nach einigen Tagen wurde die Keimrate ermittelt und nach circa zwei Wochen wurde bestimmt, wie viele Keimlinge Kanamycinresistenz besitzen.

## 2.2.6 Biolistische Transformation von *Malus x domestica* und *Nicotiana tabacum*

Bei der biolistischen Transformation oder Biolistik werden mit DNA-beschichtete Gold-Partikel mit hoher Geschwindigkeit auf das zu transformierende Pflanzenmaterial geschossen (**Abbildung 5**).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten mit dem Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System in Kombination mit dem Biolistic Optimization Kit von Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien).

Die Durchführung der biolistischen Transformation erfolgte durch Lucia Becker (Becker 2016).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips eines Partikelbeschusses**

Gas strömt in das Gas Acceleration Tube, bis der spezifische Druck unter dem die Rupture Disc platzt, erreicht ist. Durch die entstehende Heliumdruckwelle wird der Macrocarrier beschleunigt, bis er auf das Stop-Gitter trifft und abrupt abgebremst wird. Die mit DNA beschichteten Microcarrier durchdringen das Stop-Gitter und dringen in das zu transformierende Pflanzenmaterial ein.

### 2.2.6.1 Zur Übertragung verwendete DNA

Für den biolistischen Beschuss wurden zirkuläre Plasmide (pCAMBIA1305.1) verwendet, die mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (**Kapitel 2.1.13**) aus *E. coli* isoliert wurden.

### 2.2.6.2 Pflanzenmedien und Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurden Blätter von acht bzw. elf Wochen alten Sprossspitzenkulturen von *Nicotiana tabacum* bzw. Blätter von vier Wochen alten Sprossspitzenkulturen von *Malus x domestica* 'Royal Gala' verwendet. Die Kulturbedingungen entsprachen denen bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation (**Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.5.3**). Der Beschuss und die anschließende Kultur der Blattstücke erfolgten auf #53-Medium mit Zusatz von 10 mg/l Hygromycin.

### 2.2.6.3 Vorbehandlung der Goldpartikel und Präzipitation

Für die Durchführung von insgesamt 14 Beschüssen wurden 2,8 bis 3,0 mg Goldpartikel mit einer Größe von 0,6 µm eingewogen. Nach Zugabe von 600 µl Ethanol, anhydrous wurde eine Minute stark geschüttelt und dann kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel in 600 µl sterilem Milli-Q H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 350 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Suspension auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Es wurden jeweils 7 µg Plasmid-DNA, 175 µl CaCl<sub>2</sub> [2,5 M] und tröpfchenweise unter Schüttelbewegungen 35 µl Spermidin [0,1 M] zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis (unterbrochen von minütlichem starkem Schütteln) wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 600 µl Ethanol, anhydrous zugegeben, das Reaktionsgefäß für wenige Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Schließlich wurden die Partikel in 50 µl Ethanol, anhydrous resuspendiert.

#### **2.2.6.4 Beschuss des Pflanzenmaterials**

Zur Optimierung des Beschusses wurden der Abstand des zu beschießenden Gewebes zum Stop-Gitter (6, 9 und 12 cm) sowie der Heliumdruck (450, 650, 900 und 1100 psi), der von der verwendeten Rupture Disc abhängig ist und die Geschwindigkeit der Partikel beim Auftreffen auf das Pflanzenmaterial beeinflusst, variiert.

Der Ablauf des Beschusses erfolgte nach Empfehlung des Geräteherstellers (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Ein bis zwei Tage nach dem Beschuss wurden die Explantate einem GUS-Test unterzogen.

#### **2.2.6.5 Durchführung eines GUS-Tests**

Die GUS-Färbung ist ein histochemischer Test zum Nachweis von  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität. Die Verwendung von Gus als Reporter gen bei der gentechnischen Transformation von Pflanzenzellen ermöglicht es Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz zu ziehen.

Der GUS-Test erfolgte nach angepasstem Protokoll von Sessions et al. (1999).

Das zu untersuchende Pflanzengewebe wurde in GUS-Färbelösung (**Tabelle 34**) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgeschüttet und die Explantate in einem Essigsäure/Ethanol-Gemisch (Verhältnis 1:3) bei gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nachdem das Pflanzengewebe ausgebleicht war, wurde das Gemisch verworfen und die Explantate zweimal für je 5 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte in Ethanol [70 %].

## 2.3 Insertionsspezifische Nachweisverfahren zur genotypischen Charakterisierung transgener Linien

### 2.3.1 Nachweis transgener Sequenzen mittels Standard-PCR

Zum Nachweis transgener Sequenzen wurden zunächst Primerpaare designt, die spezifisch innerhalb der Sequenz der verschiedenen Transgene binden.

Nach Durchführung der PCR mit DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (**Tabelle 2**, **Tabelle 3**) wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Geldokumentation (**Kapitel 2.1.4**) durchgeführt. Ein Amplifikat spezifischer Größe führte zu der Annahme, dass der untersuchte Spross das entsprechende Transgen enthält.

**Tabelle 2: PCR-Ansatz mit DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific)**

Reagenzien	pro 20 µl Reaktion	Endkonzentration
DreamTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl	0,5 U
DreamTaq Puffer [10x]	2 µl	1x
dNTP Mix [10 mM each]	0,4 µl	0,2 mM each
Forward Primer [10 µM]	1 µl	0,5 µM
Reverse Primer [10 µM]	1 µl	0,5 µM
Template-DNA [5 ng/µl]	4 µl	20 ng
dH <sub>2</sub> O	11,5 µl	

**Tabelle 3: PCR-Programm "60x30DT"**

Step/Schritt	Dauer	Temperatur	
Initial Denaturation	180 Sekunden	95 °C	
Denaturation	30 Sekunden	95 °C	30 Cycles
Annealing	30 Sekunden	60 °C	
Extension	60 Sekunden	72 °C	
Final Extension	600 Sekunden	72 °C	

### 2.3.2 Bestimmung der Anzahl der ins Genom inserierten T-DNA-Kopien mittels Southern Blot

Die Durchführung des Southern Blots diente zur Bestimmung der Anzahl der Kopien des Gens *MdCo31* im Genom der transgenen Linien.

Digoxygenin (DIG) ist eine häufig verwendete Alternative zum Einsatz von Radioisotopen. Die Verwendung nicht-radioaktiver Methoden hat den Nachteil, dass ein hoher unspezifischer Hintergrund das spezifische Signal "überschatten" kann. Des Weiteren sind unspezifische Signale möglich, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren (Engler-Blum et al. 1993; Kim et al. 2010).

Mittels PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden spezifische Digoxygenin-markierte Sonden nach Protokoll des Herstellers amplifiziert. Die zur Transformation verwendeten Vektorplasmide dienten hierbei als Template.

Bei der Durchführung des Southern Blots wurde zunächst genomische DNA (**Kapitel 2.1.1**) mit dem Restriktionsenzym *HindIII* über Nacht nach Herstellerangaben vollständig verdaut (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4: Ansatz einer Restriktionsverdauung für einen Southern Blot**

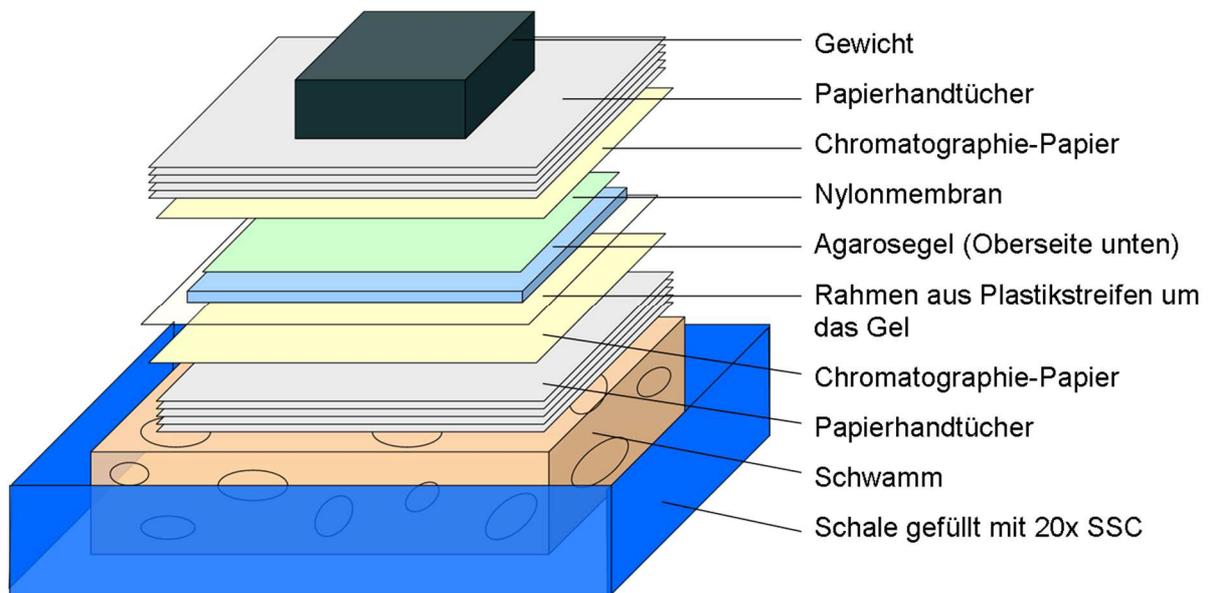
Reagenzien	pro 25 µl Ansatz	Endkonzentration
Genomische DNA	x µl	10-20 µg
Restriktions-Puffer [10x]	2,5 µl	1x
<i>HindIII</i> [10 U/µl]	2,5 µl	25 U
dH <sub>2</sub> O	Ad 25 µl	

Am nächsten Tag wurde der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, eine Elektrophorese durchgeführt und schließlich nach 15-minütiger Behandlung in 0,0005%iger Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht fotografiert.

Anschließend wurde das Gel zur Depurinierung der DNA für 5 min in 250 mM HCl gegeben. Nach zweimal 15 min in Denaturation-Solution (**Tabelle 35**) und zweimal 15 min in Neutralization-Solution (**Tabelle 36**) folgten weitere 15 Minuten in 20x SSC (**Tabelle 37**). Im Anschluss an Depurinierung, Denaturation bzw. Neutralisation wurde jeweils zweimal 10 Minuten in dH<sub>2</sub>O gewaschen.

Eine zugeschnittene Nylon-Membran wurde mit wenigen Tropfen dH<sub>2</sub>O befeuchtet und ebenfalls in 20x SSC geben. Schließlich wurde der Blot aufgebaut (**Abbildung 6**).

Hierzu wurde ein vollständig mit 20x SSC durchtränkter Schwamm mit getränkten Papiertüchern bedeckt. Es folgte eine Lage SSC getränktes Chromatographie-Papier und ein Rahmen aus Plastikstreifen, auf den das Gel unter Vermeidung von Luftblasen mit der Oberseite nach unten aufgelegt, mit 20x SSC beträufelt und schließlich mit der Nylon-Membran bedeckt wurde. Den Abschluss bildete eine weitere Lage SSC getränktes Chromatographie-Papier sowie eine große Menge trockene Papiertücher. Der Aufbau wurde mit einem Gewicht beschwert und über Nacht stehen lassen.



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Southern Blot**

Am nächsten Morgen wurde der Aufbau vorsichtig entfernt und die Membran auf mit 2x SSC angefeuchtetes Filterpapier gegeben. Mittels UV-Crosslinker wurde die DNA auf der Membran fixiert. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Membran mit der Oberseite nach innen in ein Röhrengefäß gegeben und 10 ml auf Hybridisierungstemperatur  $T_{Hyb}$  (**Tabelle 5**) vorgewärmte „DIG easy Hyb“-Hybridisierungs-Lösung (Roche, Mannheim, Deutschland) zugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei  $T_{Hyb}$ . Währenddessen wurden 30  $\mu$ l Sondenlösung zu 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gegeben, für 10 min bei 95 °C erhitzt und in Eiswasser wieder heruntergekühlt. Nach Ablauf der Stunde wurde die Hybridisierungs-Lösung erneuert, die Sondenlösung zugegeben und über Nacht bei  $T_{Hyb}$  rotieren lassen.

**Tabelle 5: DIG-markierte Sonden**

Sonde	Sonde [bp]	GC-Gehalt [%]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>Hyb</sub> [°C]
GUS_P	708	54	71,1	50,0
Hygromycin	699	57	72,3	50,0
MdCo31	762	41	65,84	45,0

GC-Gehalt = Anteil von Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen

T<sub>m</sub> [°C] = Schmelztemperatur der Sonde in °C

$T_m = 49,82 + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) - 600/\text{bp Sonde}$

T<sub>Hyb</sub> [°C] = Errechnete Hybridisierungstemperatur in °C

T<sub>Hyb</sub> = T<sub>m</sub> - (20 bis 25 °C)

Am folgenden Tag wurde die Sondenlösung verworfen und die Membran in Post-Hyb-Wash-Solutions (**Tabelle 38**) gewaschen.

Zunächst wurde die Membran zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in Wash 1-Solution, anschließend zweimal 15 Minuten bei 68 °C in vorgewärmter Wash 2-Solution und schließlich zweimal 15 Minuten bei 68 °C in vorgewärmter Wash 3-Solution inkubiert.

Es folgte die DIG-Antikörper-Bindung mit dem "DIG Wash and Block Buffer Set" (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) nach Herstellerprotokoll.

Im Anschluss wurde die Nylon-Membran zwischen zwei Seiten einer klarsichtigen Folie mit 1 ml CDP-Star betropft und 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Herausstreifen der überschüssigen CDP-Star-Lösung wurde die Membran eingeschweißt. Nach weiteren 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Chemilumineszenz mittels MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems) detektiert.

### 2.3.3 Nachweis von direkten T-DNA-Repeats mittels „reverse Primer PCR“

Neben der Insertion mehrerer Kopien der T-DNA an verschiedenen Stellen des Genoms können die Kopien auch direkt aufeinanderfolgen (head-to-tail [**Abbildung 7**], head-to-head, tail-to-tail). Komplexe T-DNA-Repeat-Strukturen treten – abhängig von verschiedenen Faktoren – regelmäßig bei *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers auf und führen häufig zu verminderter Genexpression und Gen-Silencing.

Die rpPCR zum Nachweis von direkten Repeats wurde gemäß der Arbeitsanweisung von Kumar und Fladung (2000) durchgeführt.

Isolierte genomische DNA (**Kapitel 2.1.1**) wurde zur Durchführung einer PCR verwendet (**Tabelle 6, Tabelle 7**).

**Tabelle 6: Ansatz einer rpPCR**

Reagenzien	20 µl Ansatz	Endkonzentration
Genomische DNA [5 ng/µl]	4 µl	20 ng
Primer_for [10 µM] ( <b>Tabelle 8</b> )	1 µl	0,5 µM
Primer_rev [10 µM] ( <b>Tabelle 8</b> )	1 µl	0,5 µM
dNTPs [10 mM]	0,4 µl	200 µM
Phusion GC Puffer [5x]	4 µl	1x
Phusion DNA Polymerase [2 U/µl]	0,2 µl	0,02 U/µl
dH <sub>2</sub> O	9,4 µl	

**Tabelle 7: Thermocycler-Einstellungen zur Durchführung der rpPCR**

Step/Schritt	Dauer	Temperatur	
Initial Denaturation	300 Sekunden	95 °C	
Denaturation	30 Sekunden	95 °C	30 Cycles
Annealing	30 Sekunden	60 °C	
Extension	330 Sekunden	68 °C	
Final Extension	420 Sekunden	72 °C	

Abhängig davon, ob die transgene Linie aus der Transformation mit einem pCAMBIA1305.1-Vektor (**Kapitel 2.2.1.1**) oder einem pART27-Vektor (**Kapitel 2.2.1.2**) hervorgegangen ist, wurden vier bzw. sechs Primer verwendet, die in verschiedenen

Kombinationen letztlich fünf bzw. drei Primerpaare bildeten (**Tabelle 8**). Da die Primer entgegengesetzt orientiert sind, erfolgt im Falle der Integration einer einzelnen Kopie oder einer mehrfachen Integration an voneinander entfernten Stellen des Genoms keine Amplifikation. Bei transgenen Linien, die direkt aufeinanderfolgende Repeats aufweisen, kommt es dagegen zur Amplifikation. Das Ergebnis der rpPCR mit verschiedenen Primerpaaren gibt Auskunft, ob es sich um vollständige oder unvollständige Kopien der T-DNA handelt.

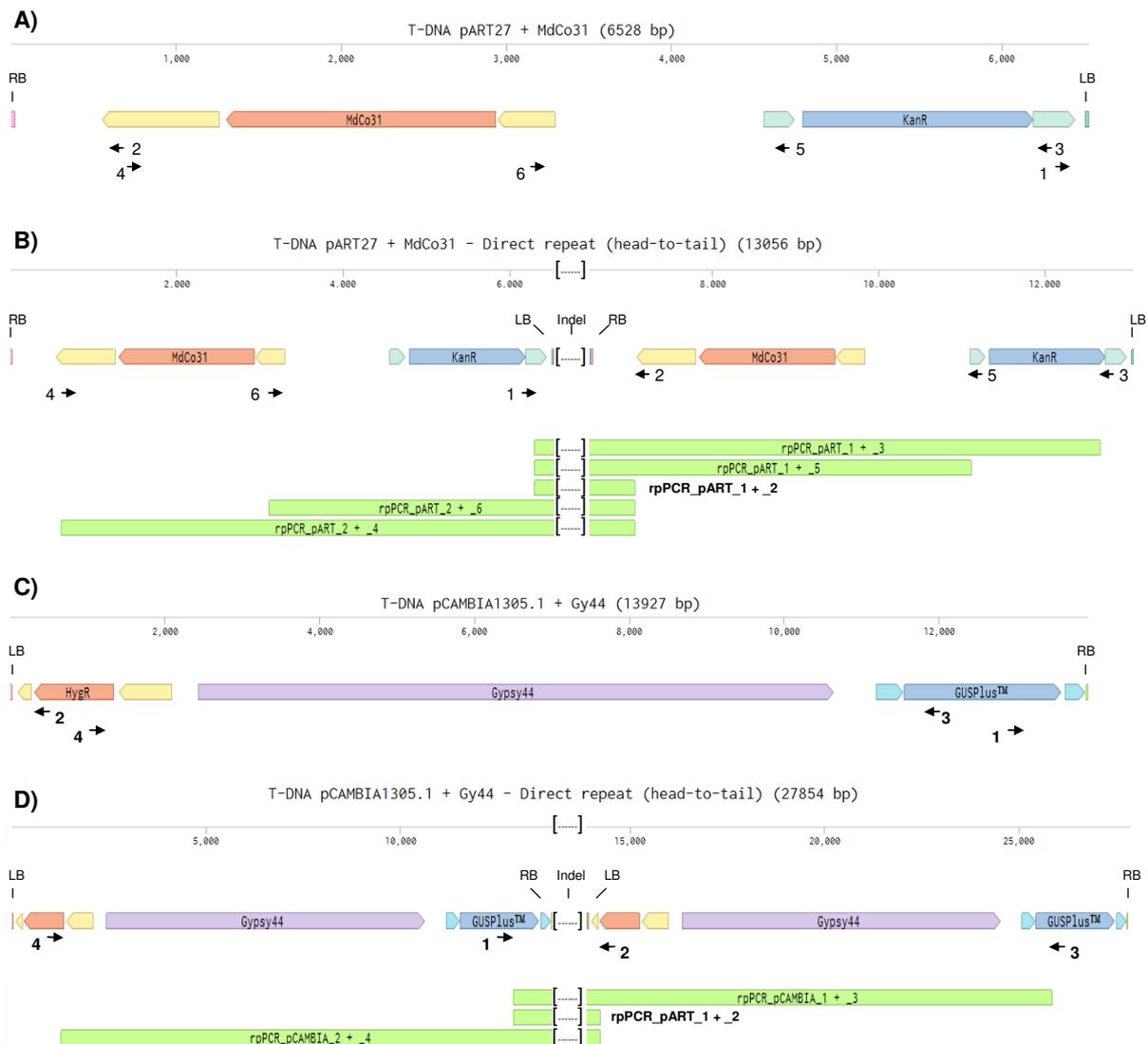
Zum Nachweis, ob eine vollständige Version der T-DNA ins Genom inseriert wurde, wurde das Primerpaar rpPCR\_pART\_3 + rpPCR\_pART\_4 verwendet. Im Gegensatz zu den übrigen Primer-Paaren sind die Primer nicht entgegengesetzt orientiert, sondern zueinander gerichtet. Die Bindungsstellen befinden sich in der Nähe der LB- bzw. RB-Sequenz. Ein Amplifikat von circa 5521 bp Länge deutet darauf hin, dass eine vollständige Kopie der T-DNA ohne Strangbrüche vorliegt.

**Tabelle 8: Für die rpPCR verwendete Primerpaare**

<b>pART27-Vektor</b>		
<b>Primer_for</b>	<b>Primer_rev</b>	<b>Zu erwartende Größe des PCR-Produkts</b>
rpPCR_pART_1	rpPCR_pART_2	762 bp
rpPCR_pART_1	rpPCR_pART_3	6361 bp
rpPCR_pART_1	rpPCR_pART_5	4811 bp
rpPCR_pART_4	rpPCR_pART_2	6450 bp
rpPCR_pART_6	rpPCR_pART_2	3947 bp

<b>pCAMBIA1305.1-Vektor</b>		
rpPCR_pCAMBIA_1	rpPCR_pCAMBIA_2	1332 bp
rpPCR_pCAMBIA_1	rpPCR_pCAMBIA_3	12979 bp
rpPCR_pCAMBIA_4	rpPCR_pCAMBIA_2	12992 bp



**Abbildung 7: Schematische Darstellung direkter Repeats (head-to-tail)**

A) T-DNA des Vektors pART27 + MdCo31 mit rechter (RB) und linker (LB) Bordersequenz sowie Selektionsgen (*KanR*) und „Gen von Interesse“ (*MdCo31*) inklusive Promotoren und Terminatoren. Die mit Zahlen beschrifteten schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsstellen der Primer, die Pfeilrichtung entspricht der Orientierung. Die Primer, die jeweils ein Paar bilden (**Tabelle 8**), sind entgegengesetzt orientiert, wodurch eine Amplifikation nur bei Vorhandensein von direkt aufeinanderfolgenden Kopien der T-DNA möglich ist.

B) T-DNA-Repeat des Vektors pART27 + MdCo31 in Tandemform (head-to-tail). Direkte Repeats weisen in der Regel mehr oder weniger kurze Indels zwischen den angrenzenden Bordersequenzen auf. Die bei Durchführung einer PCR zu erwartenden Amplifikate sind in Form von grünen Balken dargestellt. Die Amplifikation mit verschiedenen Primerpaaren gibt Auskunft, ob es beim Einbau zum Bruch einer oder beider T-DNA-Kopien gekommen ist.

C) T-DNA des Vektors pCAMBIA1305.1 + Gy44 mit Selektionsgen (*HygR*), Reporter-gen (*GUSPlus™*) und „Sequenz von Interesse“ *Gypsy-44* (*Gypsy44*).

D) T-DNA-Repeat des Vektors pCAMBIA1305.1 + Gy44 in Tandemform (head-to-tail).

### 2.3.4 Bestimmung des Insertionsorts der T-DNA mittels inverser PCR

Zur Bestimmung des Insertionsortes gibt es verschiedene Strategien, die sich betreffend der Kosten, des Aufwands und der Zuverlässigkeit mehr oder weniger stark voneinander unterscheiden (Hui et al. 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die inverse PCR (iPCR) zur Bestimmung des Einbauortes gewählt. Es handelt sich hierbei um eine schnelle und kostengünstige Methode, die ausschließlich auf Standardverfahren beruht (**Abbildung 8**).

Untersucht wurden aus der Transformation mit pART27-Vektor hervorgegangene, transgene Linien von *Nicotiana tabacum* und *Malus x domestica*.

Die Durchführung der iPCR erfolgte nach einer modifizierten Version des Protokolls von Boulin und Bessereau (2007).

Zunächst wurde genomische DNA (**Kapitel 2.1.1**) mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym (*TaqI*, *HpaII* oder *HindIII*) über Nacht nach Herstellerangaben restringiert (**Tabelle 9**).

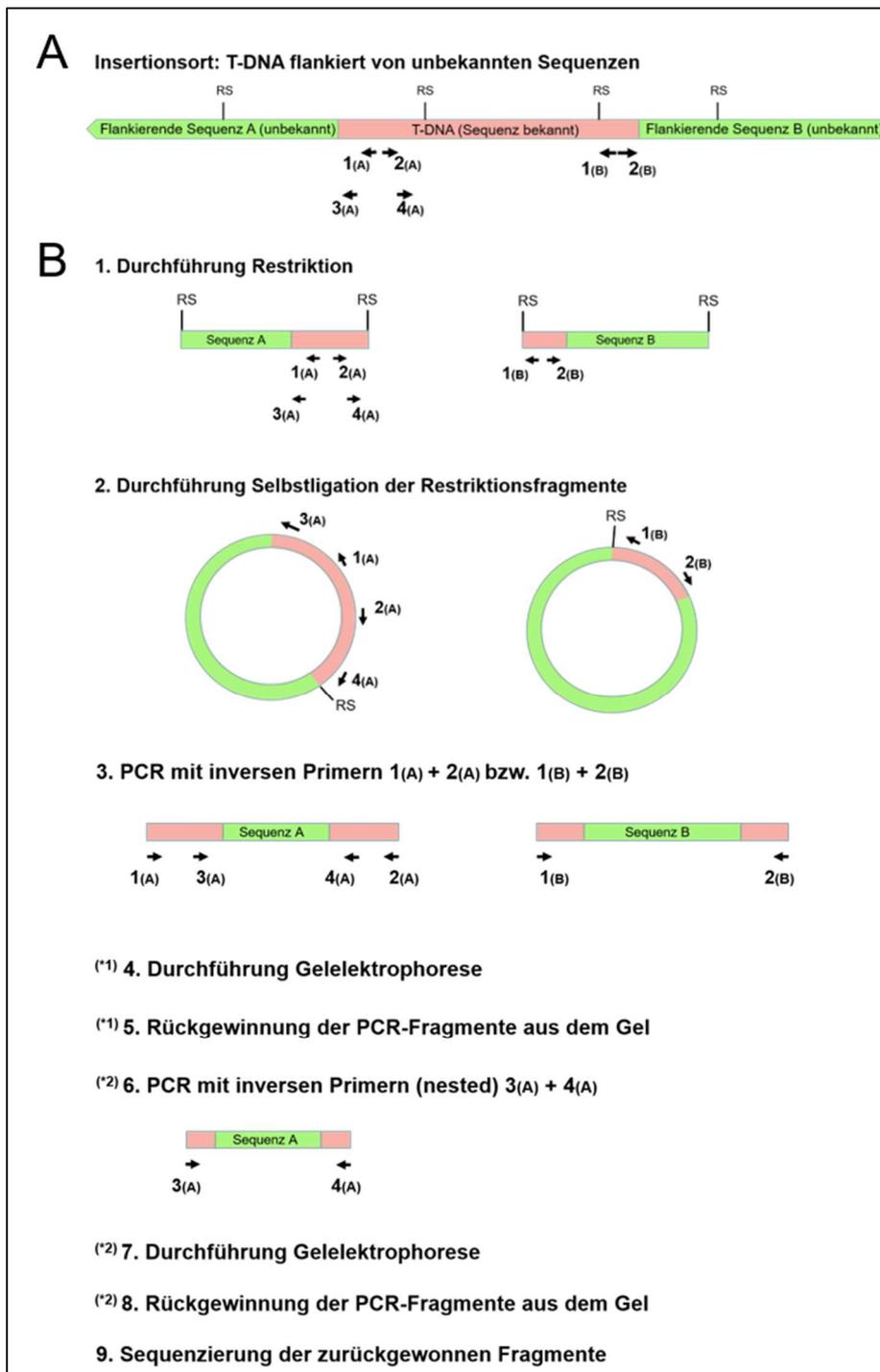
**Tabelle 9: Ansatz einer Restriktionsverdauung**

Reagenzien	40 µl Ansatz	Endkonzentration
Genomische DNA [5 ng/µl]	30 µl	150 ng
Restriktionspuffer [10x]	4 µl	1x
Restriktionsenzym [10 U/µl]	0,5 µl	5 U
dH <sub>2</sub> O	5,5 µl	

Anschließend wurde eine PCI-Extraktion (**Kapitel 2.1.2**) durchgeführt und in 30 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgte eine Ligation bei 4 °C über Nacht (12 bis 16 h) und Reaktionsbedingungen, die eine Selbst-Ligation der Restriktionsfragmente begünstigten (**Tabelle 10**).

**Tabelle 10: Ligationsansatz zur Selbstligation von Restriktionsfragmenten**

Reagenzien	25 µl Ansatz	Endkonzentration
Aufgereinigte, verdaute DNA [1:10 verdünnt]	3 µl	~ 15 ng
Ligationspuffer [10x]	2,5 µl	1x
T4 Ligase [5 Weiss U/µl]	1 µl	5 Weiss U
dH <sub>2</sub> O	18,5 µl	



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der inversen PCR**

A) zeigt eine mögliche Verteilung der Restriktionsschnittstellen (RS). Die beschrifteten, schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsstellen der verwendeten Primer. Die Primer 1(A) + 2(A), 1(B) + 2(B) und 3(A) + 4(A) bilden jeweils ein Primerpaar.

B) zeigt den Ablauf der inversen PCR.

(\*1) Die Arbeitsschritte 4 und 5 wurden bei der Identifikation der unbekannt flankierenden Sequenz A übersprungen, stattdessen wurde im Anschluss an die erste PCR direkt die zweite PCR mit nested Primern durchgeführt.

(\*2) Die Arbeitsschritte 6 bis 8 wurden - mangels nested Primern - bei der Identifikation der unbekannt flankierenden Sequenz B übersprungen.

Am nächsten Morgen wurde der Ansatz einer erneuten PCI-Extraktion unterzogen und in 30 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgte die erste Runde der iPCR (**Tabelle 11**, **Tabelle 13**). Die Primerpaare zur Identifikation der unbekannt flankierenden Sequenzen A bzw. B (**Abbildung 8**) sind in **Tabelle 12** einzusehen. Aufgrund der Verteilung der Restriktionsschnittstellen auf der T-DNA war die Bestimmung der flankierenden Sequenz B nur möglich, wenn die Verdauung der genomischen DNA zuvor mit *HpaII* erfolgt war.

**Tabelle 11: Ansatz der ersten Runde der iPCR**

Reagenzien	25 µl Ansatz	Endkonzentration
Aufgereinigte Ligation [1:5 verdünnt]	6 µl	[~ 3 ng]
Primer_for [10 µM] ( <b>Tabelle 12</b> )	2,5 µl	1 µM
Primer_rev [10 µM] ( <b>Tabelle 12</b> )	2,5 µl	1 µM
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	200 µM
Phusion GC Puffer [5x]	5 µl	1x
Phusion DNA Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	0,02 U/µl
dH <sub>2</sub> O	8,25 µl	

**Tabelle 12: In der ersten Runde der iPCR verwendete Primer**

	Primer_for	Primer_rev
Primerpaar zur Amplifikation der unbekannt flankierenden Sequenz A	iPCR_RB_01_for	iPCR_RB_01_rev
Primerpaar zur Amplifikation der unbekannt flankierenden Sequenz B (nur bei Proben verdaut mit <i>HpaII</i> )	iPCR_LB_01_for	iPCR_LB_01_rev

**Tabelle 13: Thermocycler-Einstellungen zur Durchführung der iPCR**

	Dauer	Temperatur	
Initial Denaturation	120 Sekunden	98 °C	30 Cycles
Denaturation	10 Sekunden	98 °C	
Annealing	30 Sekunden	65 °C	
Extension	60 Sekunden	72 °C	
Final Extension	600 Sekunden	72 °C	

Die Reaktionsansätze wurden daraufhin auf ein Agarosegel aufgetragen und einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen. Nach der Rückgewinnung aus dem Gel erfolgte die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente zur Bestimmung der flankierenden Sequenz B.

Die Verteilung der Restriktionsschnittstellen auf der T-DNA im an die unbekannt Sequenz A angrenzenden Bereich ermöglichte das Design von nested Primern. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der flankierenden Sequenz A konnten daher zur Durchführung einer zusätzlichen PCR genutzt werden (**Tabelle 14**). Die verwendeten Thermocycler-Einstellungen entsprachen denen zur Durchführung der ersten Runde der iPCR (**Tabelle 13**).

**Tabelle 14: Ansatz der zweiten Runde der inversen PCR**

Reagenzien	25 µl Ansatz	Endkonzentration
Produkt der 1. Runde iPCR [1:100 verdünnt]	1 µl	
Primer_for „iPCR_RB_02_for“ [10 uM]	2,5 µl	1 µM
Primer_rev „iPCR_RB_02_rev“ [10 µM]	2,5 µl	1 µM
dNTPs [10 mM]	0,5 µl	200 µM
Phusion GC Puffer [5x]	5 µl	1x
Phusion DNA Polymerase [2 U/µl]	0,25 µl	0,02 U/µl
dH <sub>2</sub> O	8,25 µl	

Im Anschluss wurden die Fragmente einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen, aus dem Agarosegel zurückgewonnen und sequenziert.

Schließlich wurde ein Alignment gegen das Genom sowie das Transkriptom von *Nicotiana tabacum* bzw. *Malus x domestica* mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information [NCBI]) durchgeführt.

Zur Verifizierung der BLAST-Treffer wurde eine weitere Standard-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer designt, die auf der ermittelten flankierenden Sequenz positioniert sind und gemeinsam mit einem auf der T-DNA lokalisierten Primer einen spezifischen PCR-Nachweis ermöglichen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung transgener Linien von *Nicotiana tabacum*

#### 3.1.1 Phänotyp

Aus den Transformationsversuchen mit dem Vektor pART27 + Gy44\_ORF gingen insgesamt neun transgene Linien hervor, die nachweislich den 609 bp großen open reading frame (ORF) in Kombination mit dem p35S-Promotor enthielten. Phänotypisch unterschied sich keine der transgenen Linien vom Wildtyp.

Aus vier Transformationsversuchen mit dem Vektor pART27 + MdCo31\_Sense gingen insgesamt 29 transgene Linien hervor. Nach der Kultivierung bis zur Blühreife wurden die Pflanzen auf visueller Grundlage in zwei Wuchstypen eingeteilt. 18 Linien zeigten einen kolumnar-artigen Wuchs (kurze Internodien, dunkles Grün und Riffelung der Blätter) einhergehend mit einer starken Reduktion des Streckungswachstums (Im Folgenden als „kolumnarer Phänotyp/Wuchstyp“ bezeichnet). Die Pflanzenhöhe „kolumnarer“ Individuen war im Vergleich zum Wildtyp um 80 % reduziert. Bei weiteren elf Linien war die Ausprägung der kolumnaren Merkmale in abgeschwächter Form zu beobachten (Im Folgenden als „intermediärer Phänotyp/Wuchstyp“ bezeichnet) (**Tabelle 15**). Pflanzen mit intermediärem Wuchstyp waren rund 50 % kleiner als der Wildtyp (**Abbildung 9**). Außerdem wurde beobachtet, dass vom Wildtyp über den intermediären bis hin zum kolumnaren Wuchstyp die Internodienlänge ab- und die Intensität der Grünfärbung sowie die Riffelung der Blätter zunahm (**Abbildung 10**).

Kontroll-Pflanzen, welche das Transformationsprotokoll unter identischen Bedingungen durchlaufen haben, aber anstelle von Bakteriensuspension in dH<sub>2</sub>O gegeben wurden und bei denen auf die Selektion verzichtet wurde, zeigten ebenso wie transgene Linien, welche mit dem Vektor pART27/10 (**Kapitel 2.2.1.2**) transformiert wurden, die Wuchsform des Wildtyps *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana.

Tabelle 15: Übersicht der Phänotypen der transgenen Linien

Transgene Linie	Phänotyp		
	Kolumnar	Intermediär	Wildtyp
Linie 1		x	
Linie 2	x		
Linie 3		x	
Linie 4	x		
Linie 5	x		
Linie 6	x		
Linie 7		x	
Linie 8	x		
Linie 9	x		
Linie 10	x		
Linie 11	x		
Linie 12		x	
Linie 13		x	
Linie 15	x		
Linie 16	x		
Linie 17		x	
Linie 18	x		
Linie 19	x		
Linie 20	x		
Linie 21	x		
Linie 23	x		
Linie 24	x		
Linie 25	x		
Linie 26	x		
Linie 28		x	
Linie 29		x	
Linie 30		x	
Linie 31		x	
Linie 32		x	



### 3.1.2 Genotyp

#### 3.1.2.1 Nachweis transgener Sequenzen mittels Standard-PCR

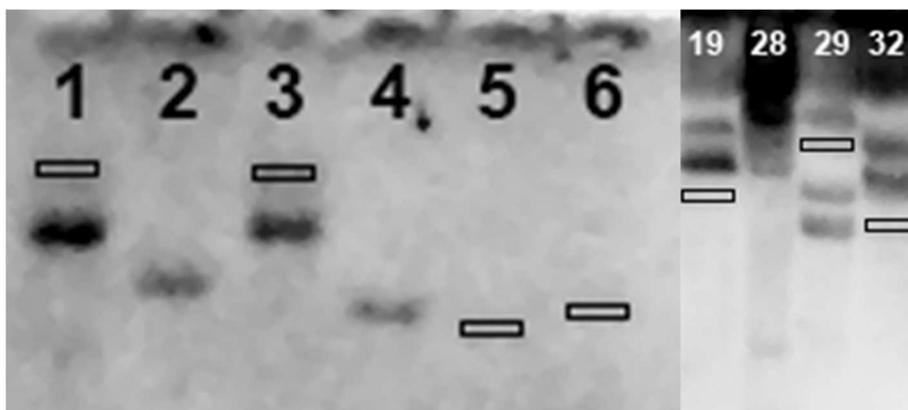
Mittels PCR mit spezifisch an die Sequenz der Transgene bindenden Primern wurde verifiziert, dass alle transgenen Linien sowohl das Selektionsgen *nptII* als auch das "gene of interest" *MdCo31* bzw. den 609 bp großen ORF von *Gypsy-44* enthalten.

Aus der Transformation mit pART27 + Gy44\_ORF hervorgegangene Linien wichen phänotypisch nicht vom Wildtyp ab. Es wurde daher von weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung des Genotyps abgesehen.

#### 3.1.2.2 Bestimmung der Kopienzahl der Transgene im Genom der erzeugten Linien von *Nicotiana tabacum*

##### Bestimmung der Kopienzahl des Gens *MdCo31* mittels Southern Blot

Ein hoher unspezifischer Hintergrund lässt eine zweifelsfreie Interpretation der Ergebnisse nicht zu. Nur in einigen wenigen Fällen lieferten die durchgeführten Blots verwertbare Ergebnisse (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11: Ausgewählte interpretierbare Ergebnisse von Southern Blots bei transgenen Linien von *Nicotiana tabacum***

Die transgenen Linien 2, 4, 5 und 6 wiesen nach Durchführung des Southern Blots jeweils nur eine Bande, die Linien 1 und 3 jeweils zwei Banden auf (**Abbildung 11**, Blot wurde wiederholt und verifiziert [nicht dargestellt]). Die Auswertung der Linien 19, 28, 29 und 32 deutet darauf hin, dass Linie 28 mindestens zwei, die Linien 19 und 32 mindestens drei und Linie 29 vier Kopien des Gens *MdCo31* im Genom enthält.

Alle an dieser Stelle nicht erwähnten Linien lieferten keine verwertbaren Ergebnisse.

**Nachweis von direkten T-DNA-Repeats in Tandemform (head-to-tail) mittels****„reverser Primer PCR“ (rpPCR)**

Das Ergebnis der rpPCR gibt Auskunft, ob T-DNA-Repeats in Tandemform vorliegen (**Tabelle 16, Spalte "\_1 + \_2"**) und ob es sich um vollständige oder unvollständige Kopien der T-DNA handelt (**Tabelle 16, Spalten "\_1 + \_5", "\_1 + \_3", "\_2 + \_6" und "\_2 + \_4"**). Die Spalte **"\_3 + \_4"** (**Tabelle 16**) gibt dagegen Auskunft, ob unabhängig vom Vorhandensein von T-DNA-Repeats mindestens eine vollständige Version der T-DNA im Genom vorliegt (**Abbildung 12**).

**Tabelle 16: Auswertung der rpPCR**

Linie	Primerpaar: rpPCR_pART_X + rpPCR_pART_Y					
	_1 + _2	_1 + _5	_1 + _3	_2 + _6	_2 + _4	_3 + _4
Linie 1	+	+	+	+	-	+
Linie 2	-	-	-	-	-	-
Linie 3	+	+	+	+	+	+
Linie 4	-	-	-	-	-	-
Linie 5	-	-	-	-	-	+
Linie 6	-	-	-	-	-	+
Linie 7	-	-	-	-	-	-
Linie 8	-	-	-	-	-	+
Linie 9	-	-	-	-	-	+
Linie 10	-	-	-	-	-	+
Linie 11	-	-	-	-	-	-
Linie 12	-	-	-	-	-	+
Linie 13	+ <sup>3x</sup>	+	+	+ <sup>2x</sup>	+	+
Linie 15	-	-	-	-	-	+
Linie 16	-	-	-	-	-	+
Linie 17	-	-	-	-	-	+
Linie 18	-	-	-	-	-	+
Linie 19	+	+	+	+	+	+
Linie 20	-	-	-	-	-	+
Linie 21	-	-	-	-	-	-
Linie 23	-	-	-	-	-	+
Linie 24	-	-	-	-	-	-
Linie 25	-	-	-	-	-	+
Linie 26	-	-	-	-	-	+
Linie 28	-	-	-	-	-	+
Linie 29	-	-	-	-	-	+
Linie 30	+ <sup>2x</sup>	+	+	+	+	+
Linie 31	+ <sup>2x</sup>	+	+	+	-	+
Linie 32	-	-	-	-	-	+

"+": Ein spezifisches Fragment konnte amplifiziert werden

"-": Es konnte kein spezifisches Fragment amplifiziert werden

"<sup>2x</sup>" bzw. "<sup>3x</sup>": Zwei bzw. drei spezifische Fragmente wurden amplifiziert



### **Deutung der Kopienzahl des Gens *nptII* anhand der Aussaat von Samen der F1-Generation unter Selektionsbedingungen**

Neben dem Southern Blot, der rpPCR und der iPCR kann auch das Kreuzungsverhältnis der aus Selbstung der transgenen Linien hervorgegangenen F1-Generation zur Ermittlung der Kopienzahl des Transgens *nptII* herangezogen werden.

Aus Selbstung hervorgegangene Samen von 18 transgenen Linien wurden unter Selektionsbedingungen ausgesät. Nach circa zwei Wochen wurde bestimmt, wie viele Samen ausgebleichen waren und damit keine Resistenz gegen Kanamycin besaßen (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Aussaat der aus Selbstung der transgenen Linien hervorgegangenen Samen der F1-Generation**

<b>F1-Aussaat von Linie</b>	<b>Anzahl Samen gekeimt</b>	<b>Anzahl Samen ausgebleichen</b>	<b>% Samen ausgebleichen</b>
1	128	0	0
3	62	4	6,5
4	68	20	29,4
5	55	11	20
6	87	20	23,0
8	101	26	25,7
9	42	8	19,0
10	109	32	29,4
11	93	17	18,3
12	85	3	3,5
13	111	1	0,9
15	98	5	5,1
17	101	28	27,7
19	89	29	33
29	99	3	3
30	98	0	0
31	107	28	26
32	100	2	2

Aus der Selbstung von hemizygoten Individuen gehen hemizygoten und homozygoten Pflanzen nach der Verteilung 0,25 AA : 0,5 Ax : 0,25 xx hervor. Entsprechend geht das hemizygot vorliegende Gen statistisch bei 25 % der Nachkommen verloren. Liegt ein Gen mit zwei bzw. drei Kopien auf nicht zueinander homologen Chromosomen vor, geht es bei 6,25 % bzw. 1,5625 % der Nachkommen verloren. Wenn eine Kopie eines Gens auf zwei zueinander homologen Chromosomen aber an unterschiedlichen Positionen

vorliegt, kann das entsprechende Gen durch Crossing-over in einzelnen Individuen der Nachkommenschaft verloren gehen.

Die Selektion mit Kanamycin hat keinen Einfluss auf die Keimung von nicht-resistenten Samen, stattdessen beginnen die Keimlinge nach kurzer Zeit auszubleichen. Bei hemizygotem Vorliegen einer Kopie des *nptII*-Gens sollten also rund 25 % der Keimlinge ausbleichen. Bei Vorhandensein von zwei bzw. drei Kopien sollten rund 6,25 % bzw. 1,5625 % der Nachkommen ausbleichen. Ein gegen Null gehender Prozentsatz an ausbleichenden Keimlingen kann auf eine sehr hohe Kopienzahl hindeuten.

Durch die enge Kopplung der Gene *nptII* und *MdCo31* sollten beide die gleiche Kopienzahl im Genom der Wirtspflanzen aufweisen. Entsprechend erlaubt der Aussaat-Test unter Selektionsbedingungen Rückschlüsse auf die Anzahl der Kopien von *MdCo31*. Jedoch sollte die Möglichkeit eines Strangbruchs der T-DNA und somit die Entkopplung der beiden Transgene nicht außer Acht gelassen werden, da es sich hierbei um ein regelmäßig auftretendes Ereignis handelt. Außerdem kann die Auswertung des Aussaat-Tests aufgrund der kleinen Strichprobe nur zu einer vagen Deutung der Kopienzahl herangezogen werden (**Tabelle 19**).

**Tabelle 19: Interpretation der Kreuzungsverhältnisse**

F1-Aussaat von Linie	% Samen ausgebleichen	Interpretation: Anzahl Kopien
1	0	Drei oder mehr Kopien
3	6,5	Zwei Kopien
4	29,4	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
5	20	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
6	23,0	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
8	25,7	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
9	19,0	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
10	29,4	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
11	18,3	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
12	3,5	Zwei bis drei Kopien
13	0,9	Drei oder mehr Kopien
15	5,1	Zwei Kopien
17	27,7	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
19	33	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
29	3	Zwei bis drei Kopien
30	0	Drei oder mehr Kopien
31	26	Eine Kopie oder gekoppelte Kopien
32	2	Zwei bis drei Kopien

### Übersicht der Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Kopienzahl der Transgene

Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Kopienzahl der Transgene im Genom von *Nicotiana tabacum* sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.

**Tabelle 20: Übersicht der *MdCo31*-Kopienzahl im Genom der transgenen Linien**

Linie	Wuchstyp	Southern Blot ( <i>MdCo31</i> -Kopien)	rpPCR	Kreuzungsverhältnis der F1-Generation ( <i>nptII</i> -Kopien)
1	intermediär	2 Kopien	head-to-tail-Repeat; das Strangende einer Kopie ist unvollständig	> 3 Kopien, alternativ: Je 1 Kopie auf 2 zueinander homologen Chromosomen
2	kolumnar	1 Kopie	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
3	intermediär	2 Kopien	head-to-tail-Repeat	2 Kopien
4	kolumnar	1 Kopie	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
5	kolumnar	1 Kopie	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
6	kolumnar	1 Kopie	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
7	intermediär	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	keine Samenbildung
8	kolumnar	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
9	kolumnar	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
10	kolumnar	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
11	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
12	intermediär	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	2 - 3 Kopien
13	intermediär	Nicht auswertbar	3 head-to-tail-Repeats	3 - 4 Kopien, alternativ: Je 1 Kopie auf 2 zueinander homologen Chromosomen
15	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	2 Kopien

Linie	Wuchstyp	Southern Blot ( <i>MdCo31</i> -Kopien)	rpPCR	F1-Aussaat ( <i>nptII</i> -Kopien)
16	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
17	intermediär	Nicht auswertbar	Keine direkten Repeats	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
18	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
19	kolumnar	3 Kopien	head-to-tail-Repeat	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
20	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
21	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
23	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
24	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
25	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
26	kolumnar	Nicht durchgeführt	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
28	intermediär	2 Kopien	Keine direkten Repeats	Nicht durchgeführt
29	intermediär	4 Kopien	Keine direkten Repeats	2 - 3 Kopien
30	intermediär	Nicht durchgeführt	2 head-to-tail-Repeats	≥ 3 Kopien
31	intermediär	Nicht durchgeführt	2 head-to-tail-Repeats; das Strangende einer Kopie ist jeweils unvollständig (location of <i>MdCo31</i> )	1 Kopie oder gekoppelte Kopien
32	intermediär	3 Kopien	Keine direkten Repeats	2 - 3 Kopien

### 3.1.2.3 Bestimmung des Insertionsorts der T-DNA mittels inverser PCR (iPCR)

Da die verfügbaren Genomdaten (*Nicotiana tabacum* (assembly Ntab-TN90), National Center for Biotechnology Information, Stand: September 2017) keine Zuordnung zu einem bestimmten Chromosom ermöglichen, wurde die iPCR nur bei wenigen ausgewählten transgenen Linien exemplarisch durchgeführt.

Nach der Sequenzierung der erhaltenen Fragmente wurde ein Alignment gegen das Genom sowie das Transkriptom von *Nicotiana tabacum* mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) durchgeführt. Die BLAST-Treffer sind in **Tabelle 21** einzusehen.

**Tabelle 21: BLAST-Ergebnisse nach Sequenzierung der erhaltenen Fragmente**

Linie	Unbekannte Sequenz <sup>(*1)</sup>	Blast Treffer	verifiziert
1	A	Insertion in nicht transkribierten Bereich (unplaced genomic scaffold109848)	ja <sup>(*2)</sup>
1	A	Insertion in transkribierten Bereich (exocyst complex component EXO70A1-like)	nein <sup>(*3)</sup>
1	A	Insertion in transkribierten Bereich (pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3)	nein <sup>(*3)</sup>
1	A	head-to-tail-Repeat	ja <sup>(*4)</sup>
1	B	head-to-tail-Repeat	ja <sup>(*4)</sup>
4	A	Insertion in transkribierten Bereich (formate-tetrahydrofolate ligase-like)	ja <sup>(*2)</sup>
5	A	Insertion in transkribierten Bereich (uncharacterized LOC107803080)	ja <sup>(*2)</sup>
6	B	Insertion in transkribierten Bereich (uncharacterized LOC107791439)	ja <sup>(*2)</sup>

(\*1) Bezieht sich auf die Bezeichnung in **Abbildung 8** in **Kapitel 2.3.4**

(\*2) Die Verifizierung erfolgte anhand einer PCR mit spezifischen Primern

(\*3) Eine PCR mit spezifischen Primern lieferte kein Amplifikat

(\*4) Vorhandensein eines head-to-tail-Repeats bei der rpPCR nachgewiesen

### 3.1.3 Expressionsanalysen mittels qPCR

#### 1. Expressionsstudie

Vier aus der Selbstung der Linie 1 hervorgegangene F1-Individuen – darunter zwei mit intermediärem und zwei mit kolumnarem Wuchstyp sowie ein Individuum des Wildtyps – wurden einer Expressionsanalyse mittels qPCR unterzogen. Während beim Wildtyp keine *MdCo31*-Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden konnte, wird *MdCo31* in allen vier transgenen Linien exprimiert (**Abbildung 13**). Bei den kolumnar-wachsenden Individuen war die Expression circa doppelt so hoch wie bei den Individuen mit intermediärem Phänotyp (**Tabelle 22**).

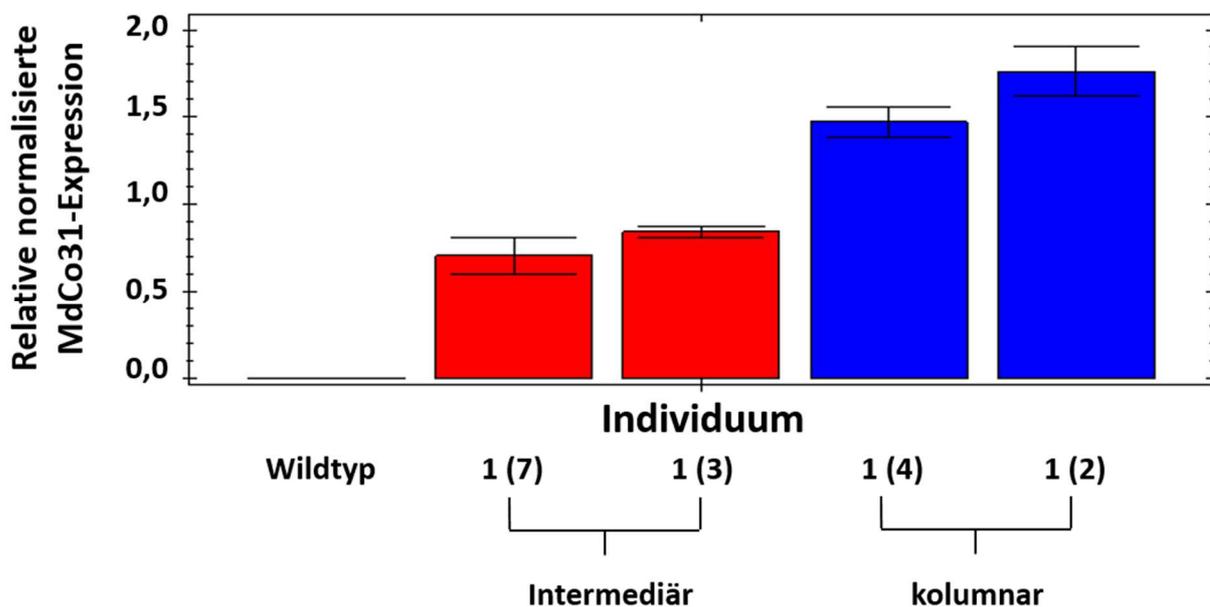


Abbildung 13: *MdCo31*-Expression in transgenen Tabak-Individuen (Studie 1)

Tabelle 22: *MdCo31*-Expression bei unterschiedlichen Wuchstypen (Studie 1)

Linie	Wuchstyp	Expression	Expression SD
WT	Wildtyp	0,00025	0,00003
1 (7)	intermediär	0,70773	0,10515
1 (3)	intermediär	0,84461	0,03056
1 (4)	kolumnar	1,47212	0,08999
1 (2)	kolumnar	1,76316	0,13693

## 2. Expressionsstudie

In einer zweiten Expressionsstudie wurden neun aus der Selbstung der Linie 1 hervorgegangene F1-Individuen (5x intermediärer Wuchstyp, 4x kolumnarer Wuchstyp) sowie ein Individuum des Wildtyps einer qPCR unterzogen. In allen transgenen Linien konnte Transkriptionsaktivität von *MdCo31* nachgewiesen werden. Der Wildtyp wies dagegen keine *MdCo31*-Expression auf (**Abbildung 14**). Im Gegensatz zur ersten Studie konnte anhand der Transkriptionsaktivität keine Unterscheidung zwischen intermediären und kolumnar-wachsenden Individuen vorgenommen werden (**Tabelle 23**).

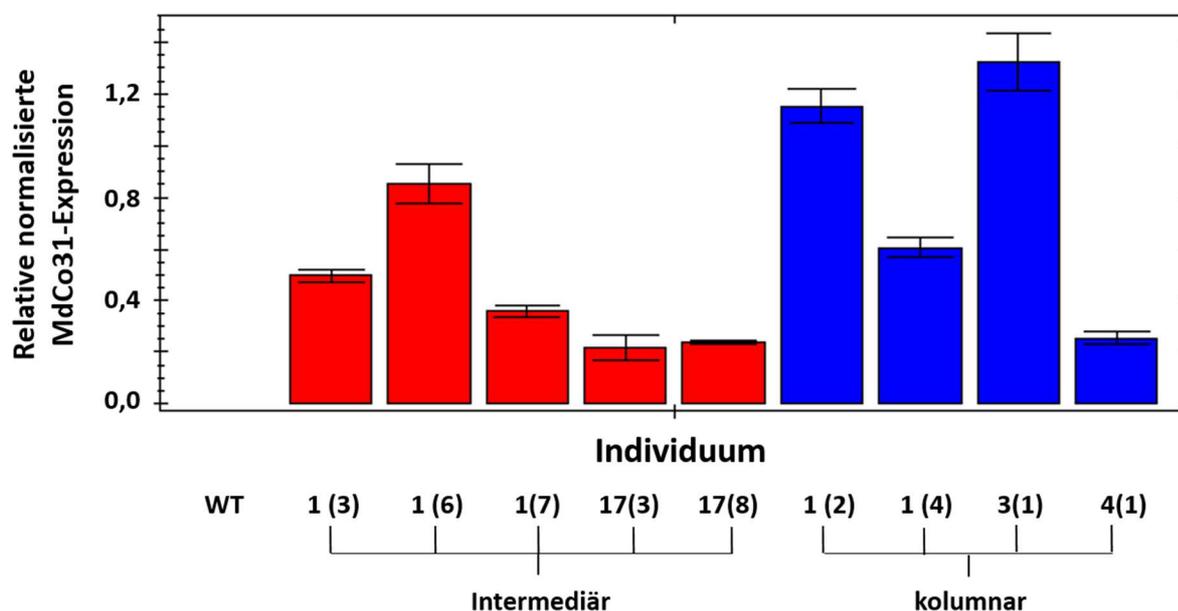


Abbildung 14: *MdCo31*-Expression in transgenen Tabak-Individuen (Studie 2)

Tabelle 23: *MdCo31*-Expression bei unterschiedlichen Wuchstypen (Studie 2)

Linie	Wuchstyp	Expression	Expression SD
WT	Wildtyp	N/A	N/A
1(3)	intermediär	0,49655	0,02519
1(6)	intermediär	0,8536	0,07585
1(7)	intermediär	0,35939	0,02592
17(3)	intermediär	0,21739	0,04858
17(8)	intermediär	0,23718	0,00881
1(2)	kolumnar	1,15188	0,06733
1(4)	kolumnar	0,60659	0,03667
3(1)	kolumnar	1,32342	0,10786
4(1)	kolumnar	0,25427	0,0244

### 3.2 Charakterisierung transgener Linien von *Malus x domestica*

Im Rahmen der Thesis wurden Transformationsversuche bei *Malus x domestica* mit unterschiedlichen Vektorplasmiden durchgeführt.

Insgesamt konnten 46 transgene Linien erzeugt werden, die eine zusätzliche Kopie des kolumnar-spezifischen *Gypsy-44*-Transposons enthalten. 12 weitere Linien enthalten das aus dem Genom eines kolumnaren Individuums isolierte Konstrukt bestehend aus *Gypsy-44* inseriert in das *Gypsy-33*-Transposon. Aus der Transformation mit dem längsten detektierten ORF (609 bp) von *Gypsy-44* in Kombination mit dem 35S-Promotor gingen insgesamt fünf Linien hervor. Eine zusätzliche Kopie des Gens *MdCo31* in Kombination mit dem 35S-Promotor zur Überexpression von Sense-Transkripten ist in zwei Linien vorhanden und zur Expression von Antisense-Transkripten in drei weiteren Linien (**Tabelle 24**).

**Tabelle 24: Übersicht der erzeugten transgenen Linien**

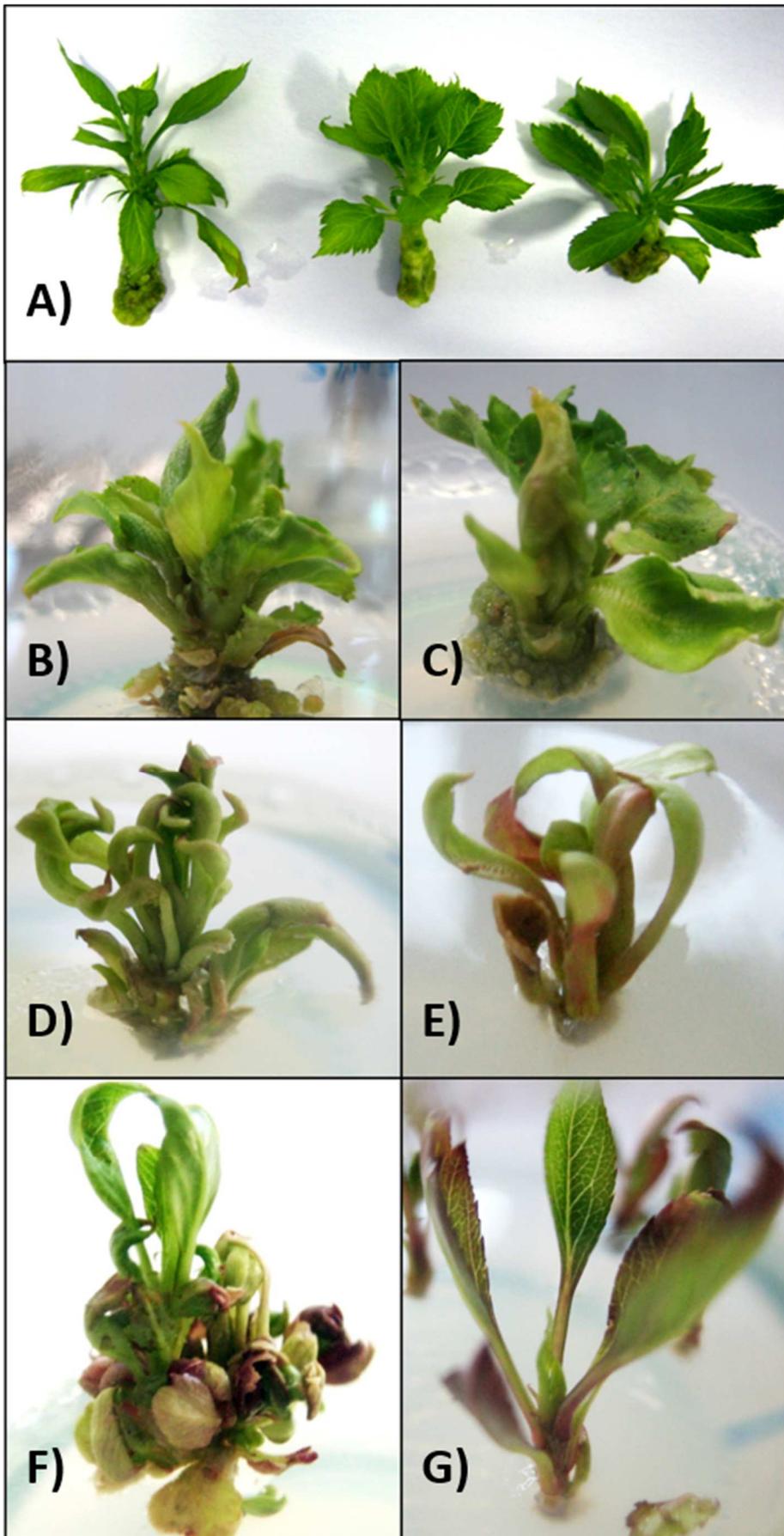
Anzahl transgene Linien	Klon/ Sorte	Vektorplasmid	Konstrukt	Wuchstyp
37	A14	pCAMBIA1305.1 + <i>Gypsy-44</i>	Zusätzliche Kopie des kolumnar-spezifischen <i>Gypsy-44</i> -Transposons	Wildtyp
9	A14	pART27 + Gy44	Zusätzliche Kopie des kolumnar-spezifischen <i>Gypsy-44</i> -Transposons	Wildtyp
12	A14	pCambia1305.1 + <i>Gypsy-33/44</i>	Zusätzliche Kopie des kolumnar-spezifischen Konstrukts <i>Gypsy-44</i> inseriert in das <i>Gypsy-33</i> -Transposon	Wildtyp
2	A14	pART27 + <i>MdCo31_Sense</i>	Zusätzliche Kopie von <i>MdCo31</i> in Kombination mit 35S-Promotor (Expression von Sense-Transkripten)	extrem verkürzte Internodien und stark verdickte, in Längsrichtung nach innen gerollte Blätter ( <b>Abbildung 15 C und D</b> )

Anzahl transgene Linien	Klon/ Sorte	Vektorplasmid	Konstrukt	Wuchstyp
3	A14	pART27 + MdCo31_Antisense	Zusätzliche Kopie von <i>MdCo31</i> in Kombination mit 35S-Promotor (Expression von Antisense-Transkripten)	Wildtyp
3	A14	pART27 + Gy44_ORF_Sense	Längster detektierter ORF (609 bp) von <i>Gypsy-44</i> in Kombination mit 35S-Promotor	stark verkürzte Internodien, verdickte, in Längs- und Querrichtung gerollte, aufrecht wachsende Blätter ( <b>Abbildung 15 D-F</b> )
2	'Royal Gala'	pART27 + Gy44_ORF_Sense	Längster detektierter ORF (609 bp) von <i>Gypsy-44</i> in Kombination mit 35S-Promotor	stark verkürzte Internodien und aufrecht wachsende Blätter ( <b>Abbildung 15 G</b> )

### 3.2.1 Phänotyp

Weder die insgesamt 46 transgenen Linien mit einer zusätzlichen kolumnar-spezifischen Kopie von *Gypsy-44* noch die 12 transgenen Linien mit dem *Gypsy-33/Gypsy-44*-Konstrukt weichen phänotypisch von den Wildtypen (**Abbildung 15 A**) ab. Das Gleiche gilt für die drei Linien, die aus der Transformation mit dem Vektor „pART27 + MdCo31\_Antisense“ hervorgegangen sind. Lediglich bei den zwei aus der Transformation mit dem Vektor „pART27 + MdCo31\_Sense“ hervorgegangenen transgenen Linien sowie bei vier der fünf Linien, die bei der Transformation mit dem Vektor „pART27 + Gy44\_ORF\_Sense“ entstanden sind, können phänotypische Unterschiede beobachtet werden.

Mit dem Vektor „pART27 + MdCo31\_Sense“ transformierte Linien besitzen extrem verkürzte Internodien und stark verdickte, in Längsrichtung nach innen gerollte Blätter (**Abbildung 15 B und C**). Transgene Linien, die aus der Transformation von Individuen des Klons A14 mit dem längsten detektierten ORF (609 bp) von *Gypsy-44* in Kombination mit dem 35S-Promotor hervorgegangen sind, besitzen ebenfalls stark verkürzte Internodien in Kombination mit verdickten, schmalen, in Längs- und Querrichtung zusammengerollten, aufrecht wachsenden Blättern (**Abbildung 15 D-F**). Die mit dem gleichen Vektor transformierte aus der Sorte 'Royal Gala' hervorgegangene Linie "T39-4" besitzt stark verkürzte Internodien und aufrecht wachsende Blätter, die jedoch weder verdickt noch gewellt sind (**Abbildung 15 G**). Alle sechs phänotypisch vom Wildtyp abweichenden Linien weisen eine geringe Wüchsigkeit sowie eine mit anhaltender Dauer der *in vitro*-Kultur abnehmende Vitalität auf. Aus diesem Grund musste auf eine Etablierung an *ex vitro* Bedingungen verzichtet.



**Abbildung 15: Wuchstypen *in vitro*-kultivierter Individuen von *Malus x domestica***

- A) Wildtypen (von links nach rechts): 'Royal Gala' (normalwüchsig), A14 (normalwüchsig), Procats (kolumnar)
- B) Linien T24-1 und C) T32-1 (beide A14 transformiert mit pART27 + MdCo31\_Sense) besitzen extrem kurze Internodien und in Längsrichtung gerollte, stark verdickte, breite Blätter
- D) Linien T40-2, E) T40-1 und F) T35-1 (alle A14 transformiert mit pART27 + Gy44\_ORF\_Sense) besitzen extrem kurze Internodien und in Längs- sowie Querrichtung gerollte, verdickte, schmale, aufrecht wachsende Blätter
- G) Linie T39-4 ('Royal Gala' transformiert mit pART27 + Gy44\_ORF\_Sense) besitzt stark verkürzte Internodien und aufrecht wachsende Blätter

**3.2.2 Genotyp**

Aufgrund der geringen Vitalität der phänotypisch abweichenden Linien und dem damit verbundenen Mangel an Pflanzenmaterial musste bei den betroffenen Pflanzen auf die Durchführung der meisten molekularbiologischen Untersuchungen verzichtet werden. Lediglich der Nachweis der transgenen Sequenzen im Genom mittels Standard-PCR konnte bei allen Linien realisiert werden.

**3.2.2.1 Nachweis transgener Sequenzen mittels Standard-PCR**

Mittels PCR mit spezifisch an die Sequenz der Transgene bindenden Primern wurde verifiziert, dass alle transgenen Linien sowohl das Selektionsgen *nptII* bzw. *hptII* als auch das jeweilige "gene of interest" bzw. die „sequence of interest“ enthalten. Lediglich bei Linie T39-3, die aus der Transformation von 'Royal Gala' mit dem Vektor „pART27 + Gy44\_ORF\_Sense“ hervorgegangen ist, fiel das erzeugte Transkript kleiner aus als erwartet. Vermutlich wurde eine unvollständige Kopie des ORFs ins Genom der betroffenen Linie eingebaut. Dies erklärt auch, warum die Linie im Gegensatz zu den vier anderen Linien, die durch die Transformation mit dem Vektor „pART27 + Gy44\_ORF\_Sense“ erzeugt wurden, phänotypisch dem Wildtyp gleicht.

### 3.2.2.2 Durchführung von Southern Blots bei transgenen *Malus x domestica*-Linien

Zur Bestimmung der Kopienzahl der Transgene *GUS\_P* und *hptII* wurde bei 16 mit dem Vektor „pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44“ transformierten Linien sowie einer mit dem Vektor „pCAMBIA1305.1 + Gypsy-33/44“ (Kapitel 2.2.1.1) transformierten Linie exemplarisch ein Southern Blot durchgeführt (Abbildung 16).



Abbildung 16: Ergebnis der bei *Malus x domestica* durchgeführten Southern Blots

Zwei *GUS\_Plus*-spezifische Banden bei den Linien T5(3)-7 und T5(3)-8 weisen darauf hin, dass mindestens zwei Kopien des Transgens im Genom der betreffenden Linien vorliegen. Die Linie T5(3)-8 weist außerdem zwei *hptII*-spezifische Banden auf. Alle anderen untersuchten transgenen Linien weisen jeweils nur eine spezifische Bande auf und sollten somit nur eine Kopie der T-DNA im Genom enthalten.

### 3.2.2.3 Nachweis von direkten T-DNA-Repeats in Tandemform (head-to-tail) mittels „reverser Primer PCR“ (rpPCR)

Die Durchführung der rpPCR mit verschiedenen Primerpaaren erlaubt es Aussagen zu treffen, ob im Genom der untersuchten Linien T-DNA-Repeats in Tandemform vorliegen. 24 aus der Transformation mit dem Vektor pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44 hervorgegangene Linien des Klons A14 wurden exemplarisch auf das Vorliegen von T-DNA-Repeats in Tandemform untersucht (**Tabelle 25**).

Bei keiner der untersuchten Linien konnte die Anwesenheit nachgewiesen werden.

**Tabelle 25: Nachweis von T-DNA-Repeats in Tandemform**

Transgene Linie	Transformationsvektor	Nachweis von T-DNA-Repeats in Tandemform
T5(1)-2	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(1)-3	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(1)-4	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(1)-5	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(1)-7	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(1)-9	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(3)-1	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(3)-5	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(3)-6	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(3)-7	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(3)-8	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T5(4)-1	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(3)-2	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(3)-3	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(4)-1	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(5)-1	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(5)-2	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T6(5)-3	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-1	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-2	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-3	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-5	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-6	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ
T12-7	pCAMBIA1305.1 + Gypsy-44	negativ

### 3.2.2.4 Bestimmung des Insertionsorts der T-DNA mittels inverser PCR (iPCR)

Die verfügbaren Genomdaten von *Malus x domestica* erlauben – im Gegensatz zu denen von *Nicotiana tabacum* – die Zuordnung einer Sequenz zu einem bestimmten Chromosom. Aufgrund des hohen Aufwands wurde die iPCR trotzdem nur bei wenigen ausgewählten transgenen Linien exemplarisch durchgeführt.

Nach der Sequenzierung der erhaltenen Fragmente wurde ein Alignment gegen die Genomdaten von *Malus x domestica* cultivar Golden Delicious (MalDomGD1.0 reference, Annotation Release 101) mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) durchgeführt (**Tabelle 26**). Die Sequenzidentität lag bei allen aufgeführten BLAST-Treffern bei mindestens 89 %.

Insgesamt wurden neun transgene Linien, die mit den Restriktionsenzymen *Hpa*II und *Taq*I in jeweils getrennten Ansätzen behandelt wurden, analysiert.

In vier Linien (T17-19, T19-1, T21-4 und T22-1) konnte ein Insertionsort bestimmt werden, wobei der BLAST bei Linie T22-1 nur gegen den Organismus "Malus (taxid:3749)" eine kurze (61 bp) aber hohe (93 %) Sequenzübereinstimmung lieferte. In Linie T21-3 erfolgte die Insertion der T-DNA scheinbar in einen hochrepetitiven Bereich. Die der T-DNA benachbarte Sequenz findet sich auf insgesamt neun Chromosomen (Chr.2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 16) wieder. Die genaue Zuordnung des Insertionsortes zu einem Chromosom ist somit nicht möglich. Die Analyse der Linie T33-1 lieferte drei Amplifikate mit BLAST-Treffern auf unterschiedlichen Chromosomen. Davon ausgehend, dass der Ablauf der iPCR fehlerfrei war, wurden demnach Kopien der T-DNA an drei verschiedenen Stellen des Genoms inseriert. Bei drei weiteren Linien (T17-15, T18-3, T33-1) lieferte die iPCR kein Ergebnis. Entweder wurde keine Sequenz amplifiziert (T17-15) oder der durchgeführte BLAST blieb ohne Treffer (T18-3, T33-1).

**Tabelle 26: BLAST-Treffer nach Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate**

Linie	BLAST gegen Database "Genome (MalDomGD1.0 reference, Annotation Release 101)"	Sequenz-identität
T17-15	iPCR hat kein sequenzierbares Amplifikat geliefert	
T17-19	chromosome 5 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg5_Scaffold50	668/676 (99 %)
T18-3	Kein BLAST-Treffer	
T19-1	chromosome 6 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg6_Scaffold53	848/908 (93 %)
T21-3	chromosome 6 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg6_Scaffold54	335/354 (95 %)
	chromosome 12, Primary Assembly	330/347 (95 %)
	chromosome 2 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg2_Scaffold35	324/344 (94 %)
	chromosome 11 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype3.MalDomGD1.0 Lg11_Scaffold94	327/353 (93 %)
	chromosome 9, Primary Assembly	327/353 (93 %)
	chromosome 4 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype2.MalDomGD1.0 Lg4_Scaffold29	316/350 (90 %)
	chromosome 3 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg3_Scaffold64	316/347 (91 %)
	chromosome 16 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype1.MalDomGD1.0 Lg16_Scaffold25	314/348 (90 %)
	chromosome 13, Primary Assembly	318/359 (89 %)
T21-4	chromosome 15 genomic scaffold, alternate locus group alt_haplotype3.MalDomGD1.0 Lg15_Scaffold150	444/453 (98 %)
T22-1	PREDICTED: Malus x domestica probable protein phosphatase 2C 24 (LOC103420436), mRNA, Chr.3*	57/61 (93 %)
T33-1	chromosome 15, Primary Assembly	96/96 (100 %)
	chromosome 10, Primary Assembly,	189/189 (100 %)
	chromosome 9, Primary Assembly	348/358 (97 %)
T33-2	Kein BLAST-Treffer	

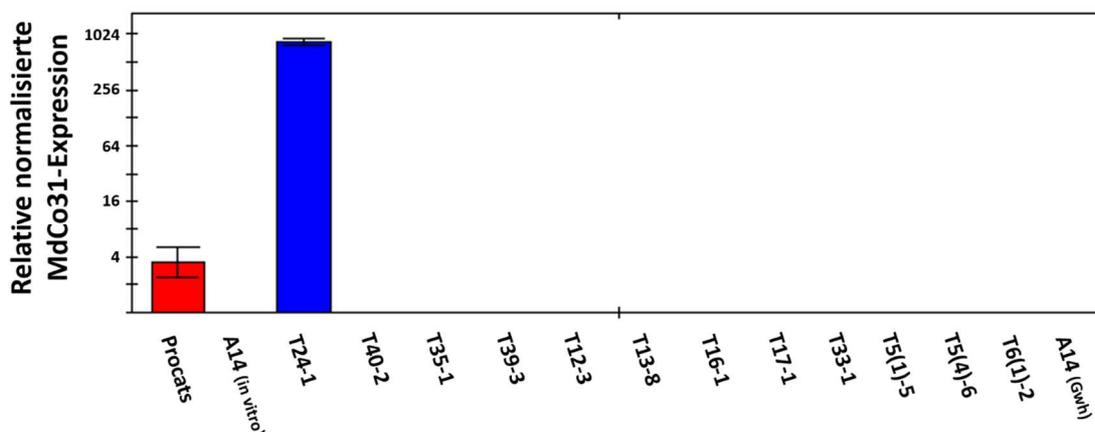
\*BLAST gegen Organism „Malus (taxid:3749)“

### 3.2.3 Expressionsanalysen mittels qPCR

Individuen aus zwölf transgenen Linien wurden einer Expressionsstudie unterzogen. Als Kontrollen dienten ein Individuum der kolumnaren Sorte 'Procats', zwei Individuen aus *in vitro*- bzw. Gewächshauskultur des normalwüchsigen Klons A14 sowie ein Individuum der transgenen Linie T33-1, welche aus der Transformation von A14 mit dem Vektor pART27/10, der kein GOI überträgt, hervorgegangen ist. Sowohl die Expression des Gens *MdCo31* (Wolters et al. 2013b) als auch der Transkriptlevel des mit 609 bp größten ORFs des Transposons *Gypsy-44* (Otto et al. 2014) wurden bestimmt. Zur Normalisierung der Expression dienten die Referenzgene *Actin* (Li und Yuan 2008) und *Md\_4592:1:a* (Botton et al. 2011), die bereits von Wolters et al. (2013b) zur Normalisierung der *MdCo31*-Expression verwendet wurden.

#### 3.2.3.1 *MdCo31*-Expression

*MdCo31*-Transkriptionsaktivität konnte nur bei der kolumnaren Sorte 'Procats' sowie der kolumnar wachsenden, transgenen Linie T24-1 beobachtet werden (**Abbildung 17**). Bei dem nicht-kolumnaren Klon A14 sowie allen entweder mit der kolumnar-spezifischen Kopie des Transposon *Gypsy-44*, der Kombination der beiden Transposons *Gypsy-44* und *Gypsy-33* bzw. dem größten ORF des Transposons *Gypsy-44* in Kombination mit dem konstitutiven Promotor p35S war die Expression von *MdCo31* kaum messbar (**Tabelle 27**). Bei der transgenen Linie T24-1 wurde dagegen ein fast 250-mal höherer Wert als bei der exemplarisch für kolumnare Phänotypen stehenden Sorte 'Procats' gemessen.



**Abbildung 17:** Transkriptionsaktivität von *MdCo31* in *Malus x domestica*

### 3.2.3.2 Transkriptionsaktivität von *Gypsy-44\_ORF*

Die im Rahmen der vorliegenden Thesis durchgeführte Expressionsanalyse ergab ein erhöhtes Vorhandensein von Transkripten der 609 bp langen ORF bei der kolumnaren Sorte 'Procats' im Vergleich zum nicht-kolumnaren Klon A14 (**Abbildung 18**). Transgene Linien (A14), die mit einer zusätzlichen kolumnar-spezifischen Kopie des Transposons *Gypsy-44* bzw. der Kombination der beiden Transposons *Gypsy-44* und *Gypsy-33* ausgestattet wurden und phänotypisch dem Wildtyp gleichen, weisen eine leicht erhöhte Expression des ORFs auf (**Tabelle 27**).

Individuen der mit dem ORF in Kombination mit dem konstitutiven Promotor p35S transformierten Linien T35-1 und T40-2 besitzen stark verkürzte Internodien und aufrecht wachsende, zusammengerollte Blätter (**Abbildung 15**). Im Vergleich zu normalwüchsigen Individuen ist die ORF-Transkriptionsaktivität um ein Mehrfaches erhöht. Die mit dem gleichen Vektor transformierte, normalwüchsige Linie T39-3 weist dagegen eine deutlich niedrigere Expression auf.

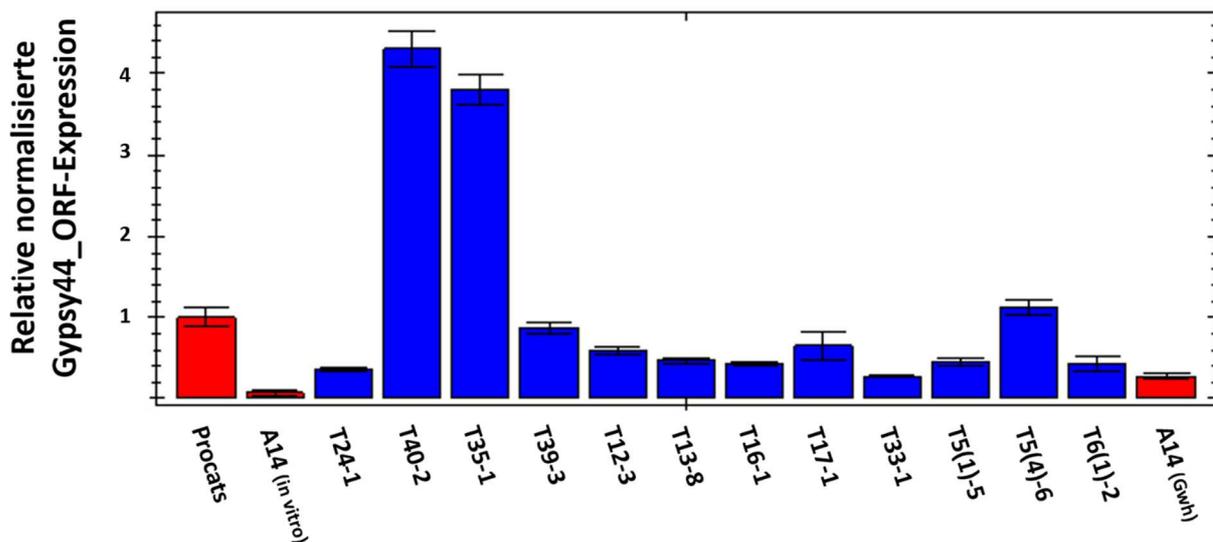


Abbildung 18: Transkriptionsaktivität von *Gypsy-44\_ORF* in *Malus x domestica*

Tabelle 27 Transkriptionsaktivität von *MdCo31* und *Gypsy-44\_ORF* in *Malus x domestica*

Sorte/Transgene Linie	Wuchstyp	Verwendeter Transformationsvektor	<i>MdCo31</i> -Expression (SD)	<i>Gypsy-44_ORF</i> -Expression (SD)
Procats	Wildtyp (kolumnar)	x	3,48645 (1,64582)	1 (0,11283)
A14 ( <i>in vitro</i> )	Wildtyp (normal)	x	N/A	0,07066 (0,02711)
T24-1 (A14)	extrem verkürzte Internodien, stark verdickte Blätter	pART27 + <i>MdCo31_Sense</i>	858,28888 (68,85448)	0,34972 (0,02561)
T40-2 (A14)	stark verkürzte Internodien, aufrecht wachsende Blätter	pART27 + <i>Gypsy-44_ORF</i>	0,00339 (0,00091)	4,30319 (0,22197)
T35-1 (A14)	stark verkürzte Internodien, aufrecht wachsende Blätter	pART27 + <i>Gypsy-44_ORF</i>	0,01318 (0,00082)	3,80296 (0,18128)
T39-3 ('Royal Gala')	Wildtyp (normal)	pART27 + <i>Gypsy-44_ORF</i>	N/A	0,86679 (0,06222)
T12-3 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-44</i>	0,01758 (0,00132)	0,5962 (0,04896)
T13-8 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-33/44</i>	0,01538 (0,00044)	0,4696 (0,03167)
T16-1 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-33/44</i>	0,01881 (0,00233)	0,42233 (0,02557)
T17-1 (A14)	Wildtyp (normal)	pART27 + <i>Gypsy-44</i>	N/A	0,65257 (0,17416)
T33-1 (A14)	Wildtyp (normal)	pART27/10 ( <i>GUS_Int</i> )	0,01101 (0,00369)	0,27573 (0,01903)
T5(1)-5 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-44</i>	0,09417 (0,00819)	0,4473 (0,0419)
T5(4)-6 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-44</i>	0,01462 (0,00592)	1,11674 (0,0959)
T6(1)-2 (A14)	Wildtyp (normal)	pCAMBIA 1305.1 + <i>Gypsy-44</i>	0,04328 (0,02157)	0,42442 (0,08838)
A14 (Gwh)	Wildtyp (normal)	x	0,07103 (0,03118)	0,2737 (0,03778)

### 3.3 Etablierung der biolistischen Transformation

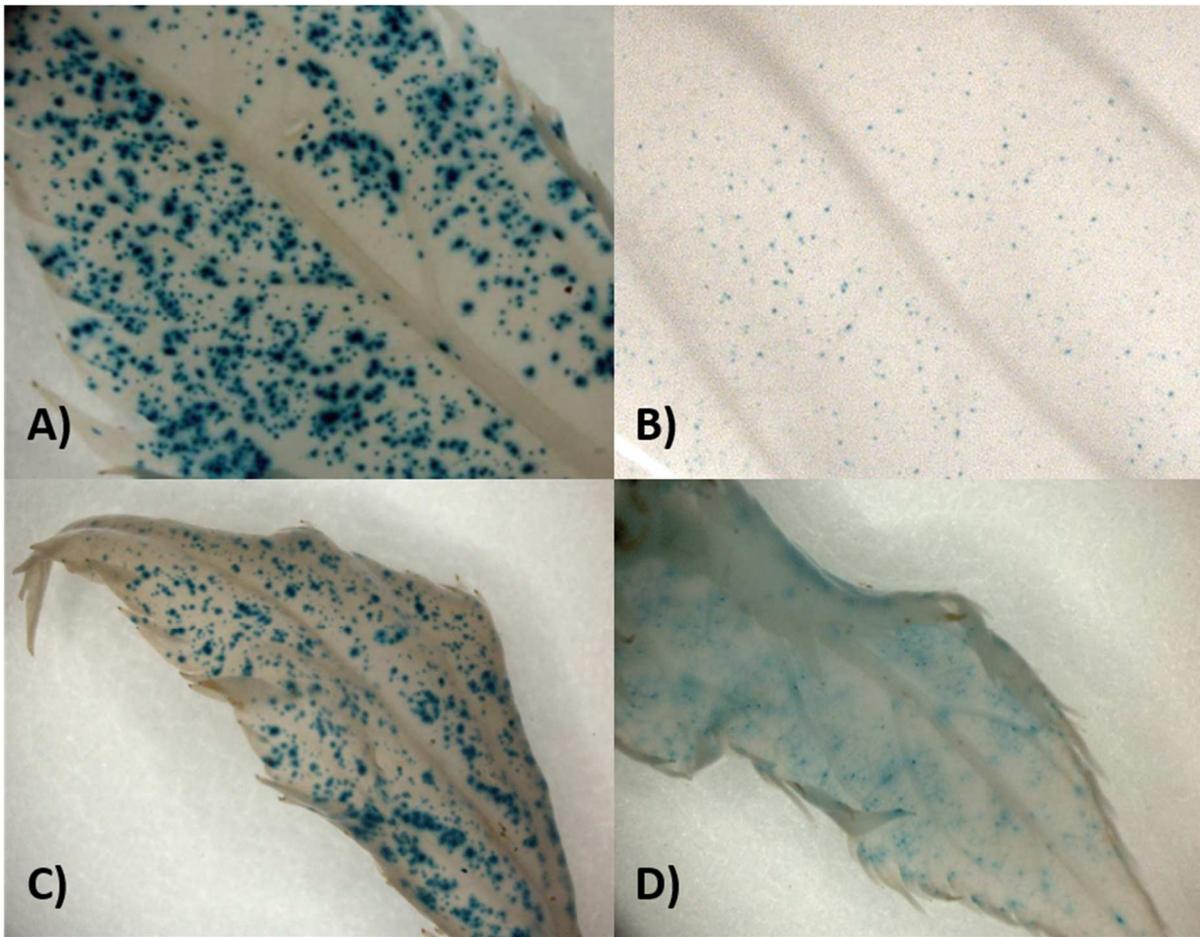
Durch Anpassung der Parameter „Abstand des zu beschießenden Gewebes zum Stop-Gitter“ und „Heliumdruck“ konnte DNA erfolgreich in Pflanzenzellen von *Nicotiana tabacum* und *Malus x domestica* 'Royal Gala' übertragen werden.

Der Beschuss von transformations-/ regenerationsfähigen Blätter von *Malus x domestica* 'Royal Gala' erbrachte bei einem Heliumdruck von 650 psi in Kombination mit einem Abstand des zu beschießenden Gewebes zum Stop-Gitter von 6 cm bzw. 9 cm die besten Ergebnisse. Der Beschuss mit einem Heliumdruck von 450 bzw. 1100 psi erzielte dagegen nur vereinzelt positive Ergebnisse. Bei acht bzw. elf Wochen alten Blättern von *Nicotiana tabacum* wurden bei einem Abstand von 6 bzw. 9 cm und einem Heliumdruck von 900 psi die besten Resultate erzielt.

Die Durchführung eines GUS-Tests ermöglichte den Nachweis, dass das übertragene Gen *GUS\_Plus* exprimiert wird.

Auffällig ist der große flächenmäßige Unterschied der GUS-Färbung zwischen *Malus x domestica* und *Nicotiana tabacum*. Während bei *Malus x domestica* große Sprenkel ganzflächig über die Blätter verteilt sind (**Abbildung 19 A**), sind bei *Nicotiana tabacum* nur sehr kleine Punkte zu beobachten (**Abbildung 19 B**).

Da Sprosse, die unter Selektionsbedingungen aus dem beschossenen Pflanzenmaterial regenerieren, GUS-negativ sind (nicht dargestellt) und die Blaufärbung am intensivsten ist, wenn der GUS-Test wenige Tage nach dem Beschuss erfolgt und abnimmt je später die Durchführung stattfindet (**Abbildung 19 C und D**), ist davon auszugehen, dass es sich um transiente Transformationen handelt und die übertragene DNA nicht ins Genom inseriert wird.



**Abbildung 19: Biolistisch beschossene Blätter nach Durchführung eines GUS-Tests**

A) Ausschnitt eines Blattes von *Malus x domestica* 'Royal Gala' beschossen mit 650 psi Heliumdruck und 9 cm Entfernung zwischen Stop-Gitter und Pflanzenmaterial

B) Ausschnitt eines Blattes von *Nicotiana tabacum* beschossen mit 900 psi Heliumdruck und 6 cm Entfernung zwischen Stop-Gitter und Pflanzenmaterial

C) Blatt von *Malus x domestica* 'Royal Gala' (Beschuss mit 650 psi und 6 cm Entfernung); die Durchführung des GUS-Tests erfolgte zwei Tage nach dem Beschuss

D) Blatt von *Malus x domestica* 'Royal Gala' (Beschuss mit 650 psi und 6 cm Entfernung); die Durchführung des GUS-Tests erfolgte sechs Tage nach dem Beschuss

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung transgener Linien von *Nicotiana tabacum*

#### 4.1.1 Kopienzahl der Transgene

Der Mechanismus des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers ist zur Steigerung der Infektionswahrscheinlichkeit von Natur aus auf die Übertragung mehrerer T-DNA-Kopien ausgelegt (Atmakuri et al. 2007; Christie und Gordon 2014). Die Möglichkeit der Übertragung einer definierten Anzahl T-DNA-Kopien ist mit dem verwendeten Transformationssystem somit nicht gegeben. Daraus resultierend enthalten transgene Linien häufig mehrere Kopien der Transgene. Die Insertion kann an verschiedenen Orten im Genom oder in Form von direkten Repeats erfolgen. Die Kenntnis der Kopienzahl ist zur Interpretation der Untersuchungsergebnisse erforderlich, da sie einen positiven (Stockhaus et al. 1987; Hobbs et al. 1993; Ku et al. 1999) oder negativen Einfluss (Hobbs et al. 1990; Jorgensen et al. 1996) auf die Expression der Transgene besitzen kann. Das Vorhandensein mehrerer Kopien eines Transgens im Genom bzw. die Transkription von invertierten Repeats kann nachweislich zum Gene-Silencing oder „Knock-down“ von Genen führen (Waterhouse et al. 1998; Chuang und Meyerowitz 2000; Schubert et al. 2004). Aus einer Studie bei *Nicotiana tabacum* geht hervor, dass die Anwesenheit multipler Kopien mit einer vermehrten Methylierung der betroffenen Bereiche korreliert (Hobbs et al. 1990).

Anhand von Southern Blots und rpPCRs konnten in 9 von 29 erzeugten Linien von *Nicotiana tabacum* mehrere Kopien eines oder beider Transgene nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Linien deutet die Aussaat der Samen der F1-Generation unter Selektionsbedingungen ebenfalls auf multiple Insertionen hin. Das Vorhandensein mehrerer Kopien des Gens *MdCo31* korreliert in hohem Maße mit der Ausprägung des intermediären Phänotyps. Die Anwesenheit mehrerer Kopien konnte bei den intermediär wachsenden Linien lediglich bei den Linien 7 und 17 nicht nachgewiesen werden. Allerdings war bei beiden Linien der Southern Blot aufgrund eines hohen, unspezifischen Hintergrundes nicht auswertbar, sodass unklar bleibt, ob tatsächlich nur eine Kopie vorliegt. Unter den kolumnar wachsenden Linien gibt es nur bei den Linien 15 und 19 Hinweise auf die Integration mehrerer Kopien der Transgene. Bei Linie 15 deutet das Kreuzungsverhältnis der aus Selbstung hervorgegangenen F1-Generation

auf die Anwesenheit von mehr als einer Kopie des mit *MdCo31* gekoppelten *nptII*-Gens hin. Allerdings konnten keine Repeats nachgewiesen und kein Southern Blot durchgeführt werden. Linie 19 weist dagegen als einzige kolumnar wachsende Linie ein head-to-tail-Repeat auf. Zudem sind aus der Selbstung hervorgegangene F1-Individuen ausnahmslos intermediär und der Southern Blot bestätigt die Anwesenheit mehrerer Kopien des Transgens *MdCo31* im Genom. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Stilllegung einer Kopie des Transgens im Genom der elterlichen Linie, verbunden mit der Reaktivierung in der F1-Generation. Belege für diese Annahme existieren allerdings keine.

Zusammengefasst korreliert der intermediäre Phänotyp in hohem Maße mit dem Vorhandensein mehrerer Kopien des Gens *MdCo31*.

#### **4.1.2 Insertionsort der T-DNA**

Bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation erfolgt die Integration der transferierten DNA-Sequenz durch nicht-homologe Rekombination (Offringa et al. 1990; Mayerhofer et al. 1991). Der Insertionsort ist zufällig und nicht vorherzusagen. Die Kenntnis von der genauen Stelle des Einbaus im Genom ist aus verschiedenen Gründen von großem Vorteil. Zum einen besteht die Gefahr, dass durch die Insertion die Kodierungssequenz oder ein regulatorisches Element eines endogenen Gens unterbrochen wird. Die Folge könnte ein Verlust der Funktionalität oder die Veränderung der Regulation des betroffenen Gens sein (Krysan 1999; Dashek und Harrison 2006). Zum anderen kann der Insertionsort einen Einfluss auf die Expression des Transgens und die Stabilität der Transformation haben (Pröls und Meyer 1992; Kohli et al. 2010). In keiner der untersuchten transgenen Linien konnten Positionseffekte nachgewiesen werden.

#### **4.1.3 Expressionsanalysen**

Die Ausprägung des kolumnaren Wachstums bei *Malus x domestica* korreliert mit einer gesteigerten *MdCo31*-Expression in sich entwickelnden Geweben (Wolters et al. 2013a; Otto et al. 2014; Petersen 2014). Transgene Linien von *Arabidopsis thaliana* (Wolters et al. 2013b), *Solanum lycopersicum* (Wolters 2014), und *Nicotiana tabacum*, welche *MdCo31* konstitutiv exprimieren zeigen Kolumnarwuchs-typische, phänotypische

Auffälligkeiten wie verkürzte Internodien bzw. Infloreszenzen, verdickte, dunkelgrüne Blätter sowie eine reduzierte Wuchshöhe. Während aus der klassischen Kreuzungszüchtung bei *Malus x domestica* Nachkommenschaften mit stufenloser Ausprägung der kolumnaren Merkmale hervorgehen, erfolgt die Ausprägung in transgenen Linien von *Nicotiana tabacum* stufenweise. Das Phänomen der stufenweisen Merkmalsausprägung zwischen transgenen Linien bei *Nicotiana tabacum* ist bekannt (Hobbs et al. 1990). Anhand von Wuchshöhe bzw. Internodienlänge lassen sich unter den transgenen Linien zwei Gruppen mit starker (kolumnarer Wuchstyp) und weniger starker Verkürzung (intermediärer Wuchstyp) bilden. Wie oben beschrieben besteht eine hohe Korrelation zwischen der Insertion mehrerer *MdCo31*-Kopien und der Ausprägung des intermediären Phänotyps.

Eine erste Expressionsstudie mit vier aus der Selbstung der transgenen Linien hervorgegangenen Individuen (2x intermediärer und 2x kolumnarer Wuchstyp) sowie einer Pflanze des Wildtyps ergab, dass die Transkriptionsaktivität von *MdCo31* bei intermediär wachsenden Pflanzen circa doppelt so hoch ist als bei stark kolumnar wachsenden. Dieser Trend konnte jedoch in einer zweiten Expressionsstudie mit neun transgenen Individuen (5x intermediärer und 4x kolumnarer Wuchstyp) und einem Individuum des Wildtyps nicht bestätigt werden. Stattdessen lag die Transkriptionsaktivität intermediär wachsender Individuen zum Teil über der von strikt kolumnar wachsenden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die RNA-Interferenz (RNAi) sein. Zur RNAi kommt es, wenn das Transkriptlevel eines Transgens einen Gen-spezifischen Schwellenwert überschreitet (Schubert et al. 2004). Eine häufige Ursache ist das Vorliegen multipler T-DNA-Kopien (Cruz und Houseley 2014). Da es sich bei der RNAi um eine Form des post-transkriptionellen Gen-Silencing (PTGS) handelt, ist eine hohe Transkription nicht grundsätzlich mit einer hohen Translation gleichzusetzen. Bedingt durch RNAi können wie im vorliegenden Fall Individuen mit mehreren Kopien des Transgens *MdCo31* eine höhere Transkriptionsaktivität als Individuen mit nur einer Kopie besitzen, aber trotzdem – aufgrund einer niedrigeren Translationsrate – eine schwächere Ausprägung der kolumnaren Merkmale aufweisen. Demnach lassen sich Individuen mit intermediärer Merkmalsausprägung nicht anhand der Transkriptionsaktivität von Individuen mit strikt kolumnarer Ausprägung unterscheiden.

#### 4.1.4 Fazit

Da ausschließlich Individuen mit *MdCo31*-Transkriptionsaktivität eine kolumnare Merkmalsausprägung aufweisen, lässt sich der kolumnare Phänotyp bei *Nicotiana tabacum* eindeutig auf die Expression von *MdCo31* zurückführen. Die Ausprägung des intermediären Wuchstyps korreliert in hohem Maße mit der Insertion mehrerer Kopien des Transgens. Positionseffekte verbunden mit der Integration des Transgens in unterschiedliche Bereiche des Genoms konnten nicht nachgewiesen werden. Der Erhalt der Funktionalität des aus *Malus x domestica* stammenden Gens *MdCo31* nach gentechnischer Übertragung in *Nicotiana tabacum* und weitere Arten deutet auf die Existenz homologer Gene und eine mögliche Funktion in einem grundlegenden Prozess hin (Wolters 2014). Im Gegensatz dazu hat die Überexpression des 609 bp großen ORFs bei *Nicotiana tabacum* keine Auswirkungen auf den Phänotyp.

## 4.2 Charakterisierung transgener Linien von *Malus x domestica*

### 4.2.1 Kopienzahl der Transgene

Aussagen über mögliche Auswirkungen der Insertion multipler T-DNA-Kopien können nicht getroffen werden, da aufgrund mangelnder Vitalität phänotypisch abweichende Linien den Analysen nicht unterzogen werden konnten.

Im Gegensatz zum Modellorganismus *Nicotiana tabacum* konnten bei keiner der 24 untersuchten transgenen Linien von *Malus x domestica* T-DNA-Repeats in Tandemform nachgewiesen werden. Das Auftreten von Insertionen in Form von direkten Repeats ist unter anderem vom verwendeten Transformationssystem (verwendeter *Agrobacterium*-Stamm/Transformationsvektor) abhängig (Kung und Arntzen 2014). Sowohl die getesteten Linien von *Malus x domestica* als auch von *Nicotiana tabacum* wurden mit dem Bakterienstamm LBA4404 transformiert. Transgene Linien von *Nicotiana tabacum* wurden jedoch mit einer Version des pART27-Vektors (Gleave 1992) transformiert, während die Transformation der untersuchten Linien von *Malus x domestica* mit rekombinierten Versionen des pCAMBIA1305.1-Vektors (pCambia vectors) erfolgte. Ob das vermehrte Auftreten direkter Repeats bei transgenen Linien von *Nicotiana tabacum* tatsächlich auf den Vektor oder das verwendete Transformationsprotokoll zurückzuführen ist, wurde nicht verifiziert.

## 4.2.2 Insertionsort der T-DNA

In keiner der transgenen Linien konnten Positionseffekte nachgewiesen werden.

## 4.2.3 Expressionsanalysen

Die Ausprägung des kolumnaren Phänotyps korreliert mit der positiven Regulation des Gens *MdCo31*. Die mit einer eingeschränkten Vitalität einhergehende extreme Ausprägung der kolumnaren Merkmale bei der transgenen Linie T24-1 ist vermutlich auf die – im Vergleich zur exemplarisch für kolumnare Phänotypen stehenden Sorte 'Procats' – um fast 250-fach erhöhte *MdCo31*-Transkriptmenge zurückzuführen. Des Weiteren konnten Untersuchungsergebnisse von Otto et al. (2014) bestätigt werden, nach denen der ORF mit unbekannter Funktion in Blättern der kolumnaren Sorte 'Procats' deutlich stärker transkribiert wird als im normalwüchsigen Klon A14. Transgene Individuen, die mit einer zusätzlichen kolumnar-spezifischen Kopie des Transposons *Gypsy-44* ausgestattet wurden, zeigen zwar eine leichte Erhöhung von Transkripten des ORFs, weichen phänotypisch aber nicht vom Wildtyp ab. Lediglich Individuen, die aus der Transformation mit dem Vektor „pART27 + *Gypsy-44\_ORF*“ hervorgegangen sind (T40-2 und T35-1), weisen dagegen eine deutliche Steigerung der Transkriptionsaktivität des ORFs auf. Obwohl die erhöhte Transkriptmenge mit kolumnar-typischen, phänotypischen Besonderheiten (stark verkürzte Internodien und aufrecht wachsende, zusammengerollte Blätter) einhergeht, korreliert die Überexpression des ORFs nicht mit einer erhöhten *MdCo31*-Transkriptionsaktivität. Die Überexpression von *MdCo31* basiert demnach nicht auf der Transkriptionsaktivität des 609 bp großen ORFs.

## 4.2.4 Fazit

Das Ergebnis der Charakterisierung der erzeugten transgenen Linien steht in Übereinstimmung mit den von Wolters et al. (2013b), Otto et al. (2014) und Okada et al. (2016) durchgeführten Untersuchungen, denen zufolge die Überexpression von *MdCo31* zur Ausprägung des kolumnaren Wachstum führt.

Da *Gypsy-44* transkriptionell aktiv ist und in 'McIntosh Wijcik' differenziell reguliert wird (Otto et al. 2014), lag die Vermutung nahe, dass ein von *Gypsy-44* stammendes

funktionelles Transkript für die erhöhte *MdCo31*-Expression verantwortlich ist. Auf Grundlage dieser Annahme wurde die Hypothese formuliert, dass die Erhöhung der Transkriptmenge des auf der kolumnar-spezifischen Kopie von *Gypsy-44* enthaltenen ORFs einen positiven Einfluss auf die Regulation von *MdCo31* besitzt. Anhand der Expressionsanalysen konnte die Hypothese widerlegt werden. Überraschenderweise zeigen transgene Linien mit erhöhter ORF-Transkription trotzdem eine kolumnar-typische Merkmalsausprägung. Inwieweit die Transkription des ORFs tatsächlich mit der Ausprägung des kolumnaren Phänotyps in Zusammenhang steht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Des Weiteren deuten die Untersuchungen darauf hin, dass replikative Transposition des LTR-Retrotransposons *Gypsy-44* einen Positionseffekt bezüglich der Transkriptionsrate von *MdCo31* bewirkt. Die zufallsbedingte Insertion (auf den Insertionsort bezogen) von *Gypsy-44* bzw. des *Gypsy-33/Gypsy-44*-Konstrukts hatte in keiner der erzeugten Linien einen Einfluss auf den Phänotyp von *Malus x domestica*. Der Einfluss eines auf *Gypsy-44* lokalisierten *trans*-wirkenden Elements (Transkriptionsfaktor, ncRNA) ist somit unwahrscheinlich.

### 4.3 Biolistische Transformation und Genome Editing

Nach Anpassung der Versuchsparameter konnte mittels biolistischer Transformation erfolgreich Fremd-DNA in Pflanzenzellen von *Nicotiana tabacum* und *Malus x domestica* 'Royal Gala' übertragen werden. Aufgrund nachlassender Intensität der GUS-Färbung sowie ausschließlich GUS-negativen Sprossregeneraten wird davon ausgegangen, dass es sich um transiente Transformationsereignisse handelt.

Die Etablierung der biolistischen Transformation dient der Realisierung von Versuchen zur gezielten Modifizierung des Apfelgenoms mittels Genome Editing.

Bei dieser Form des Genetic Engineering wird mit Hilfe von „engineered“ Nukleasen oder molekularen Scheren DNA gezielt ins Genom eingefügt, entfernt oder ersetzt. Die von *Nature Methods* zur „Method of the Year 2011“ gewählte Technik findet in vielen Bereichen der „Life Sciences“ – wie dem Studium von Genfunktionen in Pflanzen und Tieren – Anwendung. Grundlage des Genome Editing ist die Induktion von „site-specific“ Doppelstrangbrüchen (DSBs) an gewünschten Stellen im Genom, die infolge von homologer Rekombination (HR) oder „non-homologous end-joining“ (NHEJ) gezielte Mutationen (edits) verursachen. Zurzeit werden für das Genetic Engineering vier

Familien von „engineered“ Nukleasen genutzt: Meganukleasen, Zinkfingernukleasen (ZFN; Kim et al. 1996), „transcription activator-like effector-based nucleases“ (TALEN; Christian et al. 2010) sowie das CRISPR/Cas-System (Doudna und Charpentier 2014), welches 2015 von *Science* zum „Breakthrough of the Year“ gewählt wurde (Travis 2015). Die „Targeting Efficiency“, also der Prozentsatz mit dem die gewünschte Mutation erzielt wird, ist beim CRISPR/Cas-System tendenziell höher als bei ZFNs und TALENs (Liang et al. 2014; Lozano-Juste und Cutler 2014). Neben der Einfachheit, der Zugänglichkeit, den geringen Kosten und der Vielseitigkeit des CRISPR/Cas-Systems bietet es im Gegensatz zu den anderen Systemen auch die Möglichkeit, simultan an multiplen Stellen im Genom Doppelstrangbrüche zu induzieren und somit mehrere Gene zur gleichen Zeit zu editieren (Mao et al. 2013; Li et al. 2013).

Um das volle Potential der Technologie nutzen zu können, bedarf es einer effizienten Methode zur Übertragung der sogenannten „Editing reagents“ (Ran et al. 2017). Diese erfolgt bei Pflanzenzellen hauptsächlich durch Agrobakterien-vermittelte oder biolistische Transformation (Svitashev et al. 2016). Die Biolistik bietet den Vorteil, dass übertragene DNA-Vektoren in der Regel nicht in das Wirtsgenom eingebaut und nur transient exprimiert werden (Altpeter et al. 2016). Zudem können über den biolistischen Beschuss neben DNA-Vektoren auch RNAs und Proteine bzw. Ribonukleoproteine übertragen werden. Dadurch lassen sich editierte Pflanzen erzeugen, die weder Fremd-DNA enthalten noch nachweisbare Anzeichen der Veränderung besitzen und somit theoretisch nicht den Richtlinien für GMOs unterliegen (Ran et al. 2017). Ein weiterer Vorteil der Übertragung mittels Biolistik gegenüber der Agrobakterien-vermittelten Transformation ist das größere Spektrum von Pflanzenarten, die sich mit der Technik transformieren lassen (Altpeter et al. 2016).

Übergeordnetes Ziel der Etablierung der Biolistik ist die Erzeugung genetisch modifizierter Pflanzen zum Studium von Genfunktionen. Im Rahmen eines Projektes soll die Biolistik mit dem CRISPR/Cas-System kombiniert werden, um verschiedene Apfelsorten und Züchtungslinien genetisch zu editieren.

#### **4.4 *MdCo31* – Eine vermeintliche GA 2-Oxidase**

Anhand von Transformationsstudien an *Malus x domestica* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *MdCo31* die Ausprägung eines kolumnaren Phänotyps zur Folge hat. Zudem zeigen transgene, *MdCo31* konstitutiv exprimierende Linien von

*Arabidopsis thaliana* (Wolters et al. 2013b), *Solanum lycopersicum* (Wolters 2014) und *Nicotiana tabacum* (vorliegende Arbeit) verkürzte Internodien bzw. Infloreszenzen, verdickte, dunkelgrüne Blätter sowie eine reduzierte Wuchshöhe. Die Übertragung dieser für den kolumnaren Phänotyp charakteristischen Merkmale auf andere Arten deutet auf eine konservierte Funktion von *MdCo31* hin. Wolters (2014) sieht darin einen Hinweis auf mögliche homologe Gene im Genom weiterer Pflanzenarten und die Beteiligung von *MdCo31* an einem grundlegenden Prozess. Die BLAST-Suche nach dem 339 Aminosäuren großen Protein führte bislang nicht zur Identifizierung eines charakterisierten homologen Gens (Wolters 2014; Okada et al. 2016). Anhand von phylogenetischen Analysen konnte das Protein jedoch der DOXC41 Klade zugeordnet werden. Zudem deuten alle BLAST-Treffer mit hoher Sequenzübereinstimmung darauf hin, dass *MdCo31* eine vermeintliche 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase kodiert (Wolters 2014; Okada et al. 2016). Diese spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Gibberellin-Biosynthese.

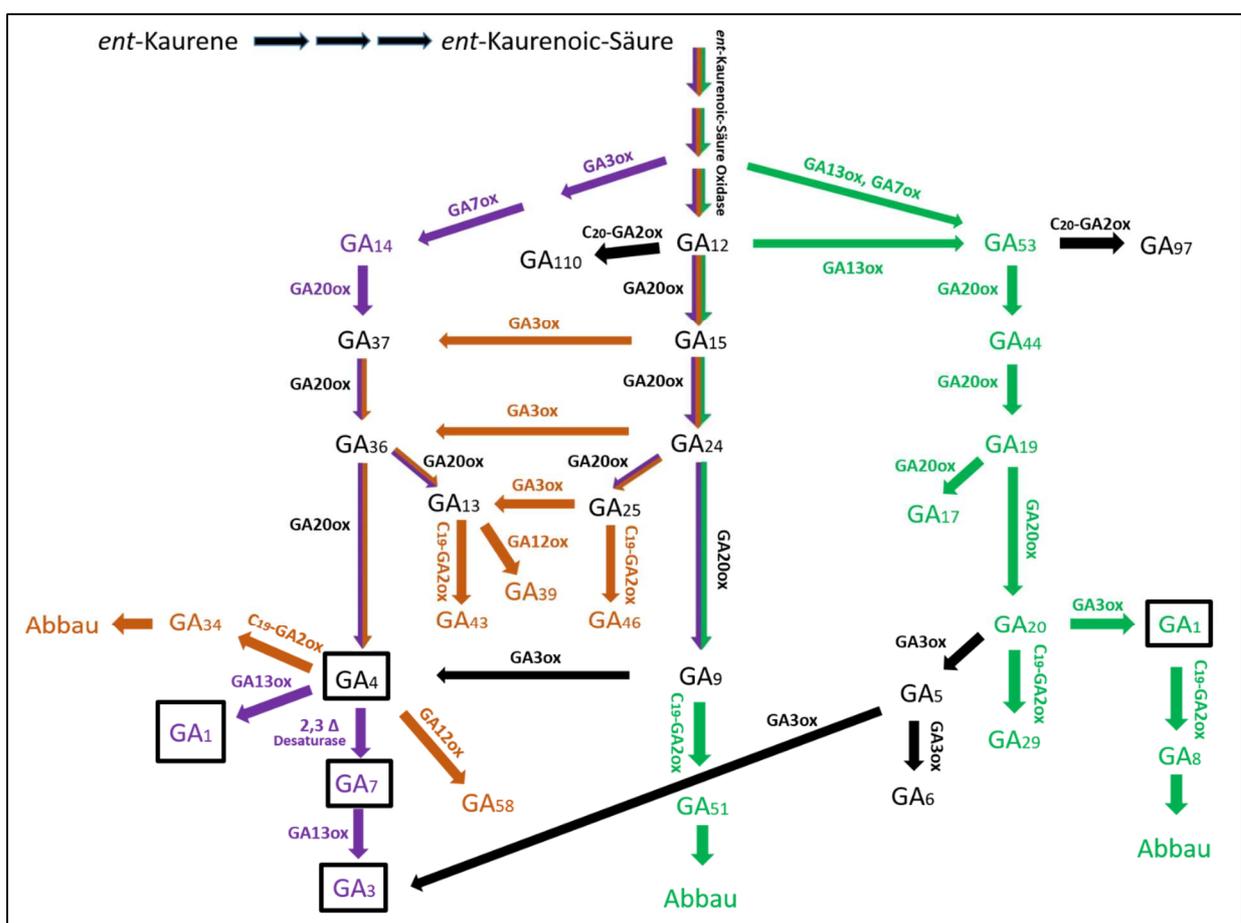
Gibberelline (GAs) sind als Wuchsregulatoren an verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen, darunter Streckungswachstum und Sprossapikalmeristem (SAM)-Funktion beteiligt (Swain und Singh 2005).

Während der GA-Biosynthese katalysieren zunächst Terpencyclasen die aus mehreren Schritten bestehende Reaktion von Geranylgeranyldiphosphat zu *ent*-Kaurene. Die Reaktion von *ent*-Kaurene zu GA12 bzw. GA14 erfolgt durch Cytochrome P450 Monooxygenasen. Die letzten Schritte der Synthese werden von Dioxygenasen (GA 20- bzw. GA 3-Oxidase) katalysiert. GA 2-Oxidase spielen dagegen eine Schlüsselrolle bei der 2 $\beta$ -Hydroxylierung, einem wesentlichen Prozess des GA-Abbaus (Helliwell et al. 2001) (**Abbildung 20**).

Die Folge der Ausschaltung oder Herunterregulierung von Terpencyclase-, Monooxygenase- oder GA 2- bzw. GA 3-Oxygenase-Genen sind GA-empfindliche, „dwarf“-Phänotypen. Entsprechende GA-defiziente Mutanten existieren in verschiedenen Pflanzenarten (Ross et al. 1997).

Die Herunterregulierung der Expression von *ent*-Kaurene-Oxidase führt beim Reis zu einer Reduzierung des Gehalts an endogenem GA1, dem wesentlichen bioaktiven Gibberellin-Vertreter in vegetativen Geweben. Betroffene Pflanzen weisen ein gehemmtes Wachstum sowie dunkle Blätter auf. Durch die Applikation von exogenem GA3 kann der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt werden (Zhu et al. 2005). Tabakpflanzen mit verminderter *ent*-Kaurene Oxidase-Expression zeigen eine

Reduzierung der Wuchshöhe infolge von verkürzten Internodien sowie dunkle Blätter (Fukazawa et al. 2000). Während die Herunterregulierung der Expression der GA 20-Oxidase-Gene *OsGA20ox2* und *OsGA20ox1* beim Reis ebenfalls zu zwergwüchsigen GA-empfindlichen Phänotypen führt (Oikawa et al. 2004), resultieren aus Überexpression des GA 3-Oxidase-Gens *PsGA3ox1* bei der Erbse Pflanzen mit verlängerten Internodien und verzögertem Blühzeitpunkt (Reinecke et al. 2013). GA 2-Oxidasen spielen dagegen eine Schlüsselrolle bei der 2 $\beta$ -Hydroxylierung. Sie katalysieren den Abbau bioaktiver GAs (GA1 und GA4) und ihrer unmittelbaren Vorstufen (GA9, GA12, GA20 and GA53) (Otani et al. 2013) (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20: GA-Biosynthesewege verschiedener Organismen**

Verändert nach Sponsel 2016 und ergänzt durch Bhattacharya et al. 2012, Tien et al. 2013, Otani et al. 2013 sowie Hedden und Thomas 2012. Dargestellt sind GA-Biosynthesewege bei *Gibberella* (lila), Kürbis (orange) und Erbse (grün) sowie weitere aus höheren Pflanzen bekannte Synthesewege (schwarz). Bioaktive GAs sind mit einem schwarzen Rahmen versehen.

Folglich hat die Überexpression von GA 2-Oxidase-Genen einen negativen Einfluss auf die Menge bioaktiver GAs (Sun 2008) und geht mit GA-Mangelsymptomen einher. Beim Reis sind zwei entsprechende Fälle bekannt.

Reispflanzen mit einer Überexpression des Gens *OsGA2ox1* weisen ein Defizit an endogenem GA1 auf, sind zwergwüchsig und besitzen verkürzte, dunkelgrüne Blätter. Außerdem werden keine Blühorgane oder Samen ausgebildet (Sakamoto 2001). Die Folge der Überregulation des Gens *OsGA2ox6* ist ein dominant zwergwüchsiger, GA-defizienter Phänotyp (Huang et al. 2010). Im Gegensatz zur Überexpression von *OsGA2ox1* wirkt sich die Mutation hauptsächlich auf den Phänotyp aus und weder die Blüte noch die Samenproduktion werden negativ beeinflusst. In beiden Fällen wird durch die Applikation von GA3 der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt (Sakamoto 2001; Huang et al. 2010).

Auch bei Pappeln ist ein vergleichbarer Fall bekannt. Die Überexpression des GA 2-Oxidase-Gens (*PtaGA2ox1*) resultiert aus der Insertion eines starken transkriptionellen Enhancers in der Nähe der TSS und ist Ursache für einen Mangel bioaktiver GAs und die Ausprägung eines zwergwüchsigen Phänotyps (Busov 2003). Wie in den zuvor beschriebenen Fällen ist der Zwerg-Phänotyp durch die Applikation von bioaktivem GA reversibel.

Die Merkmalsausprägung transgener Individuen verschiedener Pflanzenarten mit konstitutiver *MdCo31*-Expression deutet ebenfalls auf einen GA-Mangel hin.

Transgene Linien von *A. thaliana* sind zwergwüchsig und weisen im Vergleich zum Wildtyp dunklere Blätter auf. Außerdem erfolgt die Blüte verspätet und die Blütenstände sind aufgrund eines reduzierten Abstands der Blüten voneinander deutlich verkürzt (Wolters 2014; Wolters et al. 2013a).

Transgene Tomatenpflanzen mit konstitutiver *MdCo31*-Expression besitzen einen kompakten Phänotyp, dunklere Blätter und bedingt durch verkürzte Internodien ein reduziertes Höhenwachstum (Wolters 2014).

Die gleichen Symptome sind bei transgenen Tabakpflanzen mit *MdCo31*-Expression zu beobachten (vorliegende Arbeit). Betroffene Pflanzen sind phänotypisch nicht von Tabakpflanzen zu unterscheiden, die einen Mangel an bioaktiven GAs aufweisen (Fukazawa et al. 2000).

Nach der Transformation mit *MdCo31* in Verbindung mit dem konstitutiven p35S-Promotor zeigen ursprünglich nicht-kolumnare Apfel-Individuen einen extrem

kompakten Phänotyp mit stark verkürzten Internodien, fast völlig ausbleibendem Höhenwachstum und dicken, zusammengerollten Blättern.

In allen getesteten Fällen konnte der auf die *MdCo31*-Expression zurückzuführende, veränderte Phänotyp durch die Applikation von bioaktivem GA wieder aufgehoben werden (Okada et al. 2016; Wolters 2014). Daher ist anzunehmen, dass die konstitutive Expression von *MdCo31* mit einem Mangel aktiver GAs korreliert.

Da der Mangel im Fall von kolumnaren Apfelbäumen aus der Überexpression eines Gens resultiert, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei *MdCo31* um ein GA 2-Oxidase-Gen handelt. Die aus der erhöhten GA 2-Oxidase-Aktivität resultierende hohe Metabolisierungsrate führt zu einem niedrigen Gehalt bioaktiver GAs und dem Auftreten von Mangelsymptomen. Die Auswirkungen auf den Phänotyp sind reversibel, da appliziertes bioaktives GA3 nicht durch GA2-Oxidasen metabolisiert wird (Sakamoto 2001).

Zwar fehlen in der Aminosäuresequenz von *MdCo31* typische in GA-Oxidasen konservierte Domänen (Wolters 2014), es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich um eine bislang uncharakterisierte GA 2-Oxidase-Klasse handelt.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus könnten *MdCo31*-überexprimierenden Versuchspflanzen im Rahmen einer Studie verschiedene GAs appliziert werden. Anhand der Reversion des Phänotyps könnten Rückschlüsse gezogen werden, an welcher Stelle bzw. welchen Stellen der GA-Biosynthese *MdCo31* wirkt.

Des Weiteren könnte ein Vergleich des Gehalts verschiedener GAs zwischen kolumnaren und normalwüchsigen Individuen mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung zur Identifizierung von *MdCo31* beitragen.

## 4.5 Genregulation durch *cis*-regulatorische Elemente

Die Überexpression des Gens *MdCo31* korreliert mit der replikativen Transposition des LTR-Retrotransposons (Klasse-I-Transposon) *Gypsy-44* in das 5' LTR von *Gypsy-33* (Otto et al. 2014). Die Beziehung zwischen replikativer Transposition und Überexpression ist allerdings weiterhin unklar. Es existieren zahlreiche Möglichkeiten, wie die Insertion eines Retrotransposons die Regulation eines Gens beeinflussen kann. Die durch die Insertion des Transposons bedingte Disruption eines Protein-kodierenden Gens kann ausgeschlossen werden, da am Insertionsort kein Gen lokalisiert ist (Otto et al. 2014). Der Einfluss eines auf *Gypsy-44* lokalisierten *trans*-wirkenden Elements

(Transkriptionsfaktor, ncRNA) ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die durchgeführten Transformationsstudien gezeigt haben, dass die Korrelation zwischen der Anwesenheit der kolumnar-spezifischen *Gypsy-44*-Kopie und der Überexpression von *MdCo31* einem Positionseffekt unterliegt. Dieser könnte dagegen auf eine auf *Gypsy-44* lokalisierte regulatorische Sequenz hindeuten.

Regulatorische Sequenzen, auch als „*cis*-regulatory elements“ (CREs) bekannt, sind Bereiche, die in unmittelbarer Nähe oder in größerer Entfernung des regulierten Gens liegen, jedoch selbst nicht transkribiert werden. CREs wirken über die Bindung von *trans*-wirkenden regulatorischen Proteinen (Transkriptionsfaktoren), welche über eine Vielfalt an Mechanismen zur Regulation der Genexpression verfügen. Abhängig von der Art der regulatorischen Sequenz und des entsprechenden Transkriptionsfaktors wird die Transkription von Genen (differentiell) aktiviert, gefördert oder gehemmt.

Charakteristisch für regulatorische DNA-Bereiche sind DNase I hypersensitive sites (DHSs). Entsprechend bietet das Mapping dieser Bereiche mittels DNase-seq (DNase I hypersensitive sites sequencing) eine Möglichkeit zur Identifikation von CREs (Boyle et al. 2008).

Während Core-Promotoren und die zugehörigen „promoter-proximal sequence elements“ in unmittelbarer Nähe der zu regulierenden Gene zu finden sind, können Enhancer, Silencer, Isolatoren und Locus-Kontrollregionen („locus control regions“, LCRs) Zehntausende von Basenpaaren vom Transkriptionsstartpunkt („transcription start site“, TSS) entfernt lokalisiert sein.

Die Bezeichnung Core-Promotor bezieht sich im Allgemeinen auf den Transkriptionsstartpunkt inklusive der circa 30 bp upstream befindlichen TATA-Box („TF binding site“). Zur Transkription des Core-Promotors sind die 100 bis 200 bp von der TSS entfernten „promoter-proximal sequence elements“ (u.a. CCAAT-Box, GpC-Inseln) notwendig. Der Begriff Promotor umfasst den Core-Promotor mitsamt den „promoter-proximal sequence elements“. Aufgrund der CAGE-Technologie (Shiraki et al. 2003) und der Präzision, mit der sich die TSS identifizieren lässt, sind Promotoren die am besten untersuchte Klasse von regulatorischen Sequenzen (Harmston und Lenhard 2013).

Der Typ des für die Expression eines Gens verantwortlichen Promotors kann Auskunft darüber geben, ob es sich um eine Interaktion mit einem regulatorischen Element in unmittelbarer Umgebung handelt (Typ I, gewebespezifisch) oder ob die Regulation des Promotors über größere Entfernung erfolgt (Typ III, entwicklungsspezifisch) (Harmston

und Lenhard 2013). Zur Bestimmung von Interaktionen zwischen Promotoren und regulatorischen Elementen eignet sich unter anderem die Familie der „Chromosome conformation capture“ (3C) -Techniken. 3C- und 4C (Circularized Chromosome Conformation Capture) -Analysen ermöglichen die Identifikation der Interaktionen eines Ziel-Locus. Während bei der „Chromatin Interaction Analysis with Paired-End-Tag sequencing“ (ChIA-PET) -Technik das an der Interaktion beteiligte Protein (TF, RNAPolIII, ...) bekannt sein muss, unterliegt die „Chromosome Conformation Capture Carbon Copy“ (5C) -Technik dieser Limitierung nicht. Die Methode ermöglicht die Identifikation aller Interaktionen innerhalb einer genomischen Region (Mora et al. 2016). Unter den CREs, welche long-range Genregulation vermitteln, sind Enhancer und Silencer am besten untersucht. Die bis zu mehreren 100 bp langen Sequenzen bestehen aus mehreren Bindungsstellen für verschiedene TFs und Chromatin-Regulatoren. Die Interaktion zwischen Enhancern bzw. Silencern und Promotoren ermöglicht die Regulation von Genen in gewebespezifischer, entwicklungsspezifischer und quantitativer Weise. Während Enhancer in der Lage sind die Expression eines Gens zu verstärken, können Silencer die Expression schwächen.

Isolatoren sind eine weitere Klasse von CREs. Sie stellen sicher, dass funktional abgetrennte Chromatinbereiche nicht miteinander interagieren (Gerasimova et al. 2007). Abhängig von ihrer Wirkungsweise werden zwei Typen voneinander unterschieden. Barriere-Isolatoren verhindern die Ausbreitung von Heterochromatin und schützen betroffene Genbereiche vor der reprimierenden Wirkung durch Chromatinmodifikationen. Enhancer-blockierende Isolatoren stören die Interaktion zwischen Enhancern und Promotoren (Gaszner und Felsenfeld 2006). Zur Identifikation von Isolator-Elementen eignet sich das Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq), wodurch sich CTCF vermittelte Loops prognostizieren lassen (Oti et al. 2016). CCCTC-Bindungsfaktoren (CTCFs) sind zentraler Teil der Isolatoraktivität (Phillips und Corces 2009).

Eine Klasse von CREs, die hauptsächlich aus Studien an Wirbeltieren bekannt ist (Li et al. 2002), sind „Locus control regions“ (LCRs). LCRs sind als Sequenzabschnitte definiert, die die Transkriptionsrate benachbarter Gene regulieren. Sie besitzen ein hohes transkriptionssteigerndes Potential, können Target-Gene über große Distanzen aktivieren (Ho et al. 2006) und autonom regulierte Chromatin-Domänen („active chromatin hubs“, ACHs) ausbilden. Im Gegensatz zu Enhancern vermitteln LCRs Positions-unabhängige, Kopienzahl-abhängige Expression gekoppelter Transgene.

Die Funktion von LCRs basiert auf einer Modifikation der Chromatinstruktur, jedoch ist der genaue Mechanismus unbekannt. Milot et al. (1996) vermuten, dass LCRs verantwortlich sind für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer stabilen gewebespezifischen Öffnung der Chromatinstruktur eines Locus. Analog dazu deuten von Elefant (2000) generierte Daten auf die Rekrutierung und Verbreitung von Histon-Acetyltransferasen durch LCRs hin.

Das größte Problem beim Auffinden und der Bestimmung von LCRs stellt die Tatsache dar, dass sie als Ansammlung von Elementen über eine Distanz von mehr als 20 kb verteilt sein können und die Komponenten einer einzelnen LCR nicht auf eine Position (upstream oder downstream) relativ zum regulierten Gen beschränkt sein müssen.

In der Regel handelt es sich bei den Komponenten einer LCR um mehrere gewebespezifische DNase I-hypersensitive Bereiche (DHS), welche eine hohe Dichte an Bindungsstellen für TFs aufweisen (Li et al. 2002). Zwar können, wie bereits erwähnt, die Komponenten über große Distanzen verteilt liegen, jedoch ist die Funktionalität der entsprechenden LCR nur gesichert, wenn alle DHSs unverändert vorliegen (Li et al. 2002). Zwar ist die Existenz von LCRs im Genom von Pflanzen bisher nicht genauer untersucht, jedoch berichten Kodama et al. (2007) über die Möglichkeit der Anwesenheit im *Arabidopsis*-Genom.

Während Prozesse zur Kontrolle der Transkription rund um Promotoren sehr gut untersucht sind, ist die differenzielle Genregulation durch „über große genomische Distanzen“-wirkende regulatorische Sequenzen („distal regulatory elements“) weitestgehend ungeklärt.

Verschiedene Untersuchungen (FISH, ChIP-loop, ChIA-PET) deuten darauf hin, dass die physikalische Interaktion zwischen Enhancern und Promotoren eine Voraussetzung für ihre Funktion darstellt (Harmston und Lenhard 2013; Holwerda und Laat 2012). Interaktionen zwischen weit voneinander entfernten regulatorischen Elementen erfolgen über Chromatin-Modifikation (Wijgerde et al. 1995). Durch die Ausbildung von DNA-Schleifen („Loops“) kann gewährleistet werden, dass Enhancer und Silencer auch in einer Entfernung von mehreren Zehntausend Basenpaaren upstream oder downstream noch physikalisch mit dem Target-Promotor interagieren können (Harmston und Lenhard 2013). Dabei handelt es sich um einen grundlegenden Prozess. Von Boyle et al. (2008) durchgeführte Studien haben ergeben, dass nur 16 % der im Rahmen der Untersuchung beim Menschen identifizierten DHSs – welche zum Mapping von regulativen Sequenzen verwendet werden – innerhalb der Promotorregion (2 kb

upstream) oder des ersten Exons bekannter Gene liegen. Dieser Prozentsatz unterscheidet sich zum Teil stark zwischen verschiedenen Spezies. Während beim Reis (*Oryza sativa*) 24 bis 27 % der DHSs innerhalb eines Bereichs von 1 kb upstream von der TSS lokalisiert sind (Zhang et al. 2012a), sind es bei *Arabidopsis thaliana* 45 % (Zhang et al. 2012b). Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass Interaktionen zwischen Genen und entfernt lokalisierten, regulatorischen Elementen grundlegend zur Genregulation beitragen.

Sanyal et al. (2012) haben Interaktionen zwischen Genen und regulatorischen Sequenzen beim Menschen untersucht. Demnach sind rund 50 % der untersuchten TSSs an mindestens einer und bis zu 20 long-range Interaktionen beteiligt. Exprimierte TSSs weisen tendenziell mehr Interaktionen auf als nicht-exprimierte und rund 10 % der untersuchten „distal regulatory elements“ interagierten mit mindestens einer und bis zu mehr als zehn TSSs, wobei nur 7 % der Interaktionen mit der am nächsten lokalisierten TSS stattfanden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Interaktionen zwischen TSSs und Enhancern mit einer gesteigerten Transkription korrelieren (Sanyal et al. 2012).

Wie Interaktionen zwischen entfernt voneinander lokalisierten, regulatorischen Sequenzen erfolgen war lange Zeit Diskussionsthema (Kadauke und Blobel 2009).

Experimentelle Untersuchungen befürworten zwei wesentliche Modelle: Zum einen das Looping-Modell und zum anderen das Tracking/Scanning-Modell. Denkbar ist auch eine Kombination beider Modelle.

Inzwischen konnten sogenannte „looped chromatin structures“ (Loops) und ihr Einfluss auf die Regulation der Transkription (Hewetson und Chilton 2008; Hsu et al. 2010; Wicks und Knight 2011) in Studien an zahlreichen Genen (Byrd und Corces 2003; Horike et al. 2005; Jing et al. 2008; Yoon et al. 2007; Yusufzai et al. 2004) nachgewiesen werden. Loops können sowohl repressiv als auch aktivierend auf die Transkription von Genen wirken (Cournac und Plumbridge 2013) und abhängig von den beteiligten Interaktionspartnern unterschiedliche regulatorische Funktionen erfüllen (Cavalli und Misteli 2013).

- Intragenische Loops zwischen dem 5'- und 3'-Ende von Genen ermöglichen ein „Recycling“ der RNA Pol II, wodurch die Expression des betroffenen Gens gesteigert wird.

- Enhancer-Promotor-Loops führen vermittelt durch TFs zur transkriptionellen Aktivierung von Genen.

- Loops zwischen Regionen mit gebundenen Polycomb-Proteinen und Promotoren verhindern die Rekrutierung von RNA Pol II und/oder beeinträchtigen die Elongation während der Transkription.

- Isolator-vermittelte Loops zwischen zwei Isolator-Elementen grenzen individuelle Loci, bestehend aus der Kodierungssequenz eines Gens sowie *cis*-regulierenden Elementen, von der umgebenden Genomlandschaft und anderen CREs ab. Solche Isolator-Isolator-Loops können einen Bereich von 200 kb umfassen (Holwerda und Laats 2012).

Ein räumlicher Cluster aus regulatorischen Sequenzen, zwischen denen mehrere simultane Looping-Interaktionen stattfinden (z.B. Isolator-Isolator-Loops), wird als „active chromatin hub“ (ACH) bezeichnet (Tolhuis et al. 2002). ACHs besitzen eine hohe Dichte an DNA-Bindungsstellen. Die daraus resultierende hohe Konzentration an Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modifizierenden Proteinen sowie RNA Pol II ermöglicht es, Enhancern und Promotoren in direkten Kontakt miteinander zu treten, sodass eine stabile/hohe Transkription gewährleistet wird (Harmston und Lenhard 2013). Gleichzeitig werden inaktive Gene und DNA Sequenzen, die innerhalb eines ACHs intervenierend auf die Transkription wirken, durch Loops separiert (looping out) (Tolhuis et al. 2002; Laats und Grosveld 2003). Auf diese Weise bilden CREs transkriptionsregulierende, entwicklungspezifisch konservierte Kompartimente. Ein Beispiel hierfür ist der menschliche  $\beta$ -Globin ACH. Strukturelle Veränderungen in Form der räumlichen Positionierung von Genen innerhalb des  $\beta$ -Globin ACHs korrelieren mit einem „developmental switch“ der Genexpression (Palstra et al. 2003). Die Einteilung des Genoms in Kompartimente mit voneinander unabhängiger Genexpression erfordert die Existenz von Grenzen, die Crosstalk zwischen diesen Domänen verhindert. Isolatoren, eine Klasse von CREs, können diese Funktion erfüllen. Ulianov et al. (2012) haben demonstriert, dass Isolator-Elemente miteinander interagieren und die Entstehung einer gewebespezifischen Gen-Domäne durch Chromatin-Looping induzieren. In besonderem Zusammenhang mit Isolator-Aktivität stehen CTCF-Bindungsstellen bzw. -Proteine. Durch CTCF-Dimerisation zwischen zwei voneinander entfernt liegenden CTCF-Bindungsstellen kommt es zur Ausbildung von Loops (Palstra et al. 2003; Tolhuis et al. 2002). In mehreren Fällen werden aktive Genbereiche von CTCF-Bindungsstellen flankiert und dadurch von benachbartem kondensiertem, inaktivem Chromatin abgetrennt (Wallace und Felsenfeld 2007; Farrell et al. 2002). Studien haben ergeben, dass CTCF-Bindungsstellen durchschnittlich im Abstand von 35 bis 155 kb im Genom vorkommen, meist (zu 50 bis 90 %) konserviert zwischen

verschiedenen Zelltypen auftreten (Barski et al. 2007; Chen et al. 2008; Kunarso et al. 2010) und besonders in den Grenzbereichen zwischen aktivem und repressivem Chromatin zu finden sind (Cuddapah et al. 2009).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass durch Polycomb-Proteine vermitteltes Silencing, durch ein Su(Hw)-Isolator-Element geblockt und jenseits eines zweiten Su(Hw)-Elements fortgesetzt wird (Comet et al. 2006). Die Interaktion der beiden Isolator-Elemente hat dabei die Ausbildung eines DNA-Loops zur Folge (Comet et al. 2011). Diese und weitere Erkenntnisse deuten auf einen großen Einfluss von Isolatoren auf die DNA-Struktur (Splinter und Laats 2011; Handoko et al. 2011) und die Regulierung der Genexpression sowie eine mögliche durch Isolatoren vermittelte Kompartimentierung hin.

Zwar wurden Isolatoren bislang hauptsächlich in *Drosophila* und in Wirbeltieren in Form von CTCF-Bindungsstellen identifiziert, trotzdem konnten auch in Pflanzen bereits Sequenzen mit Isolator-Funktion nachgewiesen werden (Gan und Xie 2006; Hily et al. 2009). Alles in allem ist über ihren Mechanismus und ihr Vorkommen im Pflanzenreich allerdings noch wenig bekannt.

Obwohl viele Arbeitsgruppen das Looping-Modell stützen (Liu et al. 2016; Kim et al. 2015; Holwerda und Laats 2012) und die Entwicklung neuer Techniken zur Untersuchung von long-range Interaktionen zwischen chromosomalen Sequenzen bzw. zur Visualisierung der 3D-Struktur der DNA (RNA TRAP, 3C-, 4C-, 5C-Technik, Chromatin Immunoprecipitation [ChIP], ChIA-PET) den Nachweis erbracht hat, dass Gene und regulatorische Elemente in Loops angeordnet sind, ist der genaue Mechanismus der Loop-Ausbildung nicht aufgeklärt (Kadauke und Blobel 2009). Zwar ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren in den Prozess involviert sind, wie interagierende Sequenzelemente zueinander finden, ist allerdings weiterhin unklar. Eine Hypothese besagt, dass Loops aus ungezielten Kollisionen hervorgehen und durch Protein-Protein-Interaktionen stabilisiert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Ausbildung von Loops durch das bereits oben erwähnte Tracking/Scanning-Modell vermittelt wird. Demnach könnten sich an eine regulative Sequenz gebundene Proteine entlang des Chromatin-Strangs bewegen, bis eine stabile Verbindung mit einem anderen Sequenzelement eingegangen werden kann (Kadauke und Blobel 2009). Das Tracking-Modell wird durch verschiedene Untersuchungen gestützt (Zhao und Dean 2004; Wang et al. 2005) und es gibt Hinweise zur Existenz von Tracking-Zwischenprodukten (Hatzis und Talianidis 2002).

Transposons stellen eine reiche Quelle verschiedener *cis*-regulatorischen Sequenzen dar (Feschotte 2008; Trizzino et al. 2016; Chuong et al. 2017). Besonders die LTRs von Klasse I Retrotransposons enthalten häufig eine Vielfalt an Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBSs), die für die Insertion und spätere Transkription notwendig sind (Sverdlov 2000).

Der positionsabhängige Effekt von *Gypsy-44* auf die Regulation von *MdCo31* könnte demnach auf ein auf *Gypsy-44* lokalisiertes *cis*-regulatorisches Element (CRE) zurückzuführen sein.

## 4.6 Transposon-vermittelte Genregulation

Transposons, im Besonderen LTR-Retrotransposons wie *Gypsy-44*, sind ein reichhaltiges Lager für CREs. Insertionen von Transposons besitzen damit ein großes Potential, die Expression von Wirtsgenen zu regulieren (Chuong et al. 2017).

Dementsprechend ist die Regulation der Expression vieler Gene in verschiedenen Arten auf lange zurückliegende Transposon-Insertionen zurückzuführen (Britten 1996). Zum einen ist das große Potential von Transposons zur Regulation von Wirtsgenen auf ihre Anhäufung zurückzuführen. Aus dem dabei entstehenden „Rohsequenz-Material“ können sich CREs – zum Beispiel TFBSs, die häufig nur aus kurzen degenerativen Sequenzen bestehen (Wray et al. 2003) – *de novo* durch Punktmutationen entwickeln (Feschotte 2008). Zum anderen können auf Transposons lokalisierte Sequenzen – darunter *cis*-regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren – zweckentfremdet werden und neue Funktionen im Genom übernehmen. Es handelt sich hierbei um ein Ereignis, das unter dem Begriff „Exaptation“ bekannt ist (Brosius und Gould 1992). Während aus tierischen (Volf 2006; Reynolds et al. 2006; Taube et al. 2010; Micale et al. 2012) und menschlichen Systemen (Mason et al. 2010) zahlreiche Fälle von Exaptation bekannt sind, gibt es deutlich weniger Beispiele aus dem Pflanzenreich. Das bekannteste ist Insertion des *Hopscotch*-Retrotransposons 60 kb upstream des *tb1*-Locus beim Mais. Durch eine auf dem Transposon enthaltene Enhancer-Sequenz wird die Expression von *tb1* erheblich gesteigert, was bei betroffenen Individuen eine deutliche Reduzierung der Verzweigung zur Folge hat (Studer et al. 2011). Weitere Exaptationen konnten mittels verschiedener Chromatin-Immunpräzipitation-Techniken (ChIP, ChIP-PET und ChIP-seq) nachgewiesen werden (Souza, F. S. J. de et al. 2013). Auf Transposons enthaltene regulatorische Sequenzen können die Genexpression

außerdem in Form von Promotoren, Enhancern (Pi et al. 2010; Bejerano et al. 2006; Studer et al. 2011), Silencern, LCRs oder Isolatoren (Lunyak et al. 2007; Willoughby et al. 2000) beeinflussen (Wang et al. 2012).

Regulative Sequenzen in Form von alternativen Promotoren, welche die Regulation von benachbarten Genen beeinflussen können, sind häufig auf der U3-Region von LTRs lokalisiert. Die Expression des menschlichen *IL2RB*-Gens unterliegt beispielsweise einem circa 25 kb downstream gelegenen, alternativen Promotor, der auf dem LTR des THE1D Retrotransposons lokalisiert ist (Cohen et al. 2011). Die Konsequenz der durch alternative Promotoren vermittelten Expression sind alternative TSSs und damit verbunden alternative Exons. Da häufig nur das erste Exon betroffen ist und das Translation-initiiierende Codon in der Regel auf einem späteren Exon lokalisiert ist, sind Auswirkungen auf die Funktion des translatierten Proteins aber die Ausnahme (Cohen et al. 2009). Die Auswirkungen auf die Transkription können dagegen drastisch sein: Unterschiede in der Gewebe- und Entwicklungsspezifität, dem Expressionsniveau der verschiedenen Transkriptvarianten sowie Stress-induzierte Transkription sind die Folge. Im Pflanzenreich wurde der Untersuchung alternativer Promotoren bislang trotzdem wenig Beachtung geschenkt (Hernandez-Garcia und Finer 2014).

Beim Reis hat eine Analyse alternativer erster Exons gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen alternativen Promotoren und gewebe- sowie entwicklungsspezifischer Transkription besteht (Kitagawa et al. 2005). Die Existenz alternativer Promotoren für das Gen *LGD1* führt zu Transkriptvarianten mit unterschiedlicher spatiotemporaler Expression (Thangasamy et al. 2012). Gleiches gilt für die Expression des Gens *OsBWMK1*. Während eine der Transkriptvarianten des Gens räumlich und zeitlich begrenzt exprimiert wird, ist die zweite Variante konstitutiv aktiv. Außerdem liegt eine durch alternative Promotoren vermittelte Stress-induzierte Transkription vor; als Reaktion auf das Pflanzenabwehr-Signalmolekül Wasserstoffperoxid wird ausschließlich die auf den alternativen Promotor beruhende Transkriptvariante hochexprimiert (Koo et al. 2009).

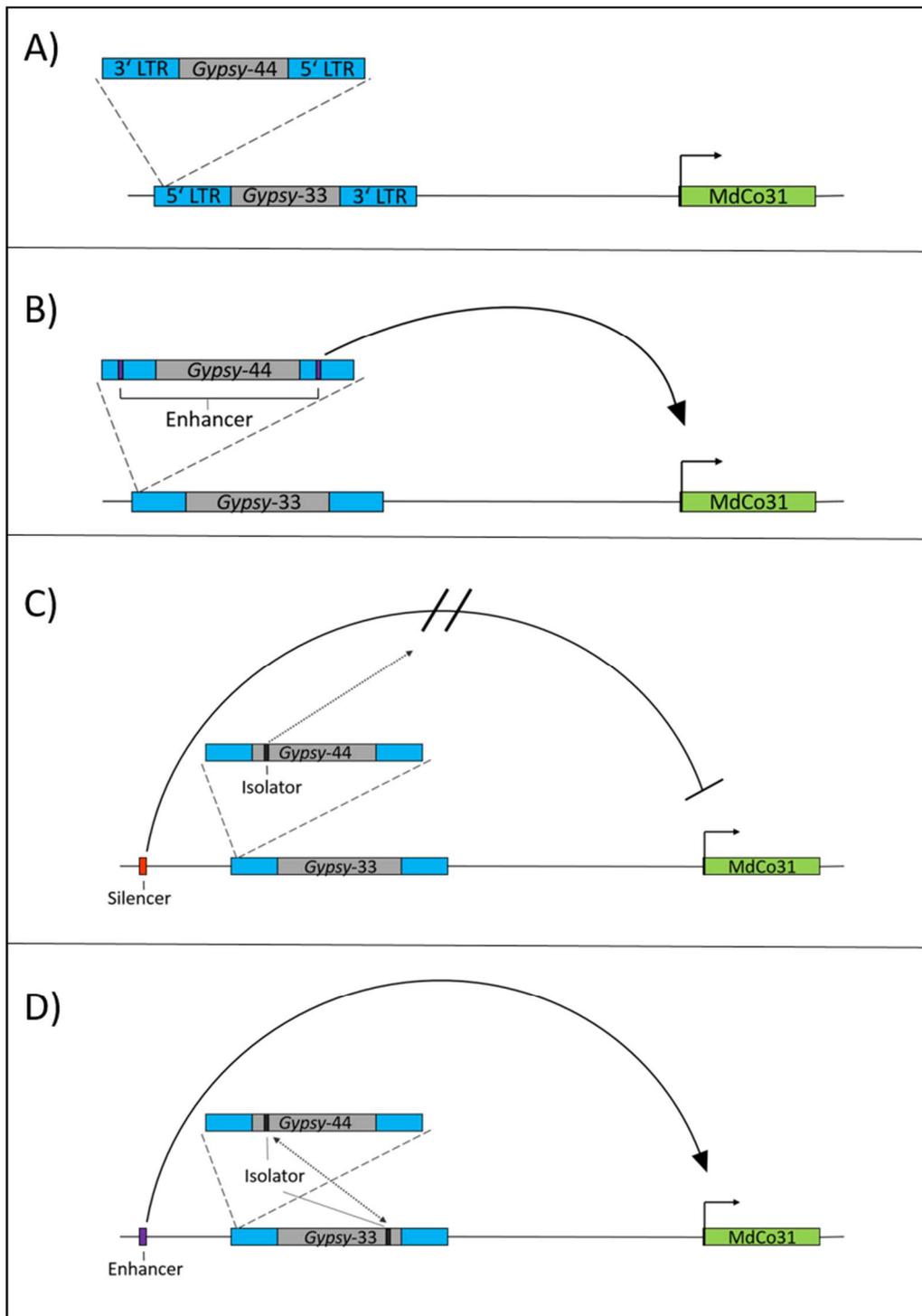
Die Expression alternativer Promotoren scheint im Allgemeinen vor allem zu einer gewebe- oder entwicklungsspezifisch regulierten Expression betroffener Gene zu führen (Baek et al. 2007; Davuluri et al. 2008). Demnach werden Gene ohne alternative Promotoren mit höherer Wahrscheinlichkeit konstitutiv exprimiert (Cohen et al. 2009). Zwar wird *MdCo31* in nicht-kolumnaren Individuen je nach Gewebe nur sehr schwach exprimiert, trotzdem ist die Expression von *MdCo31* sowohl in kolumnaren als auch in

nicht-kolumnaren Individuen auf sich entwickelnde oberirdische Gewebe beschränkt (Petersen 2014). Da keine Änderung der Gewebe- bzw. Entwicklungsspezifität nachgewiesen wurde, ist nicht davon auszugehen, dass das auf der Überexpression von *MdCo31* basierende kolumnare Wachstum auf einen alternativen Promotor zurückzuführen ist. Ein direkter Einfluss der Insertion auf den Promotor von *MdCo31* ist aufgrund der Entfernung zwischen dem Ort der replikativen Transposition und der TSSs ebenfalls unwahrscheinlich. Die Interaktion des Promotors mit einem entfernt lokalisierten *cis*-regulatorischen Element könnte die Überexpression aber erklären.

Die gesteigerte Expression von *MdCo31* könnte die Folge der Insertion einer auf *Gypsy-44* lokalisierten Enhancer-Sequenz sein (**Abbildung 21 B**). Neben der bereits erwähnten, schätzungsweise 20.000 Jahre zurückliegenden Insertion des LTR-Retrotransposons *Hopscotch* (Studer et al. 2011) existieren weitere vergleichbare Fälle. Anhand von Transformationsstudien bei Mäusen konnten Bejerano et al. (2006) nachweisen, dass eine von einem SINE-Element abstammende, nicht-kodierende Sequenz die Funktion eines entwicklungspezifischen Enhancers eingenommen hat. Außerdem wurde zwei weiteren SINE-Sequenzen eine Enhancer-Funktion im Mäuseembryo nachgewiesen (Sasaki et al. 2008). Enhancer sind häufig auf den LTRs von Retrotransposons lokalisiert (Klaver und Berkhout 1994). Dementsprechend konnte der Ursprung eines in Säugetieren vorkommenden Enhancers einem LTR-Retrotransposon zugeordnet werden (Franchini et al. 2011). Zum Nachweis von Enhancern können potentielle Enhancer-enthaltende Sequenzen in einen Vektor geklont und mit einem Minimalpromotor gekoppelt werden. Die Expression des mit dem Minimalpromotor gekoppelten Gens ist abhängig von der Existenz eines Enhancers. Zudem ermöglicht das Expressionsmuster Rückschlüsse auf die Art des Enhancers (gewebe- oder entwicklungspezifisch) (Chung et al. 2007).

Die Insertion einer auf einem Transposon lokalisierten Isolator-Sequenz kann ebenfalls einen positiven Effekt auf die Expression eines Gens besitzen.

Auf einem in Säugetieren vorkommenden SINE-Transposon ist eine Isolator-Sequenz lokalisiert, die als Barriere zwischen offenen und geschlossenen Chromatinbereichen fungiert. Die Folge ist die Regulation eines 5 kb upstream lokalisierten Locus (Lunyak et al. 2007). Die Isolator-Aktivität eines weiteren SINE-Transposons konnte anhand von Zellkultur-Versuchen und transgenen Zebrafischen nachgewiesen werden (Roman et al. 2011). Der *Gypsy*-Isolator aus *Drosophila* zählt zu den am intensivsten untersuchten Isolatoren (Wei und Brennan 2001). Zwischen Enhancer und Promotor plaziert,



**Abbildung 21: Modellvorstellungen zur differentiellen Regulation von *MdCo31***

A) Die *Co*-Region bei kolumnaren Individuen. B) Steigerung der *MdCo31*-Expression durch einen (bzw. zwei) auf *Gypsy-44* lokalisierten Enhancer. C) Steigerung der *MdCo31*-Expression durch das Unterbinden der Interaktion des Promotors mit einem upstream vom Ort der replikativen Translokation lokalisierten Silencer durch einen auf *Gypsy-44* gelegenen Isolator. D) Reaktivierung der Interaktion zwischen dem *MdCo31*-Promotor und einem Enhancer. Ein auf *Gypsy-44* lokalisierter Isolator bildet mit einem bereits vorhandenen, zwischen Enhancer und Promotor gelegenen Isolator (in der Abbildung exemplarisch auf *Gypsy-33* lokalisiert) einen Loop aus. Die Interaktion des Enhancers mit dem Promoter von *MdCo31* wird dadurch wieder ermöglicht.

blockiert der in der 5'UTR eines *Gypsy*-Retrotransposons lokalisierte Isolator die Interaktion (Gdula et al. 1996; Smith und Corces 1992; Wei und Brennan 2000). Viele auf *Gypsy*-Elementen beruhende Mutationen bei *Drosophila* sind auf diese Interaktionsblockierende Eigenschaft zurückzuführen (Gdula et al. 1996; Modolell et al. 1983; Geyer und Corces 1992).

Die differenzielle Expression von *MdCo31* bei *Malus x domestica* könnte ebenfalls auf die Wirkung eines Isolators zurückzuführen sein.

Ein auf *Gypsy*-44 lokalisierter Isolator könnte die Interaktion des *MdCo31*-Promotors mit einem möglichen Silencer unterbinden und somit die repressive Wirkung auf die *MdCo31*-Expression aufheben (**Abbildung 21 C**). Alternativ könnte die niedrige Expression bei nicht-kolumnaren Individuen auf die Lokalisation eines Isolators zwischen einem Enhancer und dem Promotor von *MdCo31* zurückzuführen sein. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Isolator-Sequenzen ist aufgrund einer hohen Dichte an *Gypsy*-Transposons upstream der TSSs von *MdCo31* erhöht. Während die Anwesenheit einer einzelnen Isolator-Sequenz einen Enhancer-/Silencerblockierenden Effekt zur Folge hat, führt das Vorhandensein einer zweiten Isolator-Sequenz zwischen Promotor und Enhancer/Silencer zur Ausbildung eines Loops und der Aufhebung der Isolator-Aktivität (Comet et al. 2011).

Durch die Insertion eines zusätzlichen auf *Gypsy*-44 lokalisierten Isolators könnte demnach die Interaktion zwischen *MdCo31*-Promotor und einem Enhancer ermöglicht werden (**Abbildung 21 D**). Die Folge wäre eine erhöhte *MdCo31*-Expression in kolumnaren Individuen.

Der Einfluss einer LCR auf die Expression von *MdCo31* ist dagegen unwahrscheinlich. Zwar besitzen LCRs ebenso wie Enhancer ein hohes transkriptionssteigerndes Potential und können Target-Gene über große Distanz aktivieren (Ho et al. 2006), jedoch ist ihre Funktionalität nur gesichert, wenn alle Komponenten, die über große Distanzen sowohl upstream als auch downstream zum regulierten Gen lokalisiert sein können, unverändert vorliegen (Li et al. 2002). Zudem ist die Existenz von LCRs im Pflanzenreich bislang nicht nachgewiesen und es konnte noch kein Zusammenhang zwischen den Komponenten einer LCR und von Transposons abstammenden Sequenzen festgestellt werden. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass die Transposition von *Gypsy*-44 mit der Regulierung der Genexpression durch eine LCR in Verbindung steht. Unwahrscheinlich ist ebenfalls, dass es infolge der replikativen Transposition von *Gypsy*-44 zu einer insertionsbedingten Disruption eines *cis*-

regulatorischen Elements und damit einer Beeinträchtigung der Interaktion eines CREs mit dem Promotor von *MdCo31* gekommen ist. Da die Insertion in den 5' LTR von *Gypsy-33* erfolgte und beide LTRs eine sehr hohe Sequenzidentität aufweisen, wäre eine zusätzliche Kopie eines von der Insertion betroffenen CREs auf der 3' LTR weiterhin unverändert vorhanden.

Neben der Regulation über *cis*-regulatorische Elemente wäre auch der Einfluss einer *cis*-wirkenden ncRNA, die die Expression benachbarter Gene steigert, denkbar (Ørom et al. 2010; Lai et al. 2013). *Gypsy-44* ist transkriptionell aktiv und besitzt mehrere kurze ORFs unbekannter Funktion (Petersen 2014). Die Möglichkeit der Transkription Enhancer-ähnlicher ncRNAs ist daher nicht auszuschließen.

Des Weiteren besitzen Transposons die Eigenschaft die Genexpression durch *trans*-wirkende Sequenzen zu beeinflussen (Hoen und Bureau 2012). Auf Transposons enthaltene Sequenzen können beispielsweise Transkriptionsfaktoren kodieren (Lin et al. 2007; Feschotte und Pritham 2007; Feschotte 2008; Negi et al. 2016).

Im vorliegenden Fall konnte allerdings anhand von Transformationsstudien nachgewiesen werden, dass die zufallsbedingte Insertion (auf den Insertionsort bezogen) von *Gypsy-44* bzw. des *Gypsy-33/Gypsy-44*-Konstrukts keinen Einfluss auf den Phänotyp von *Malus x domestica* besitzt. Der Einfluss von *Gypsy-44* auf die Expression von *MdCo31* unterliegt demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit einem Positionseffekt. Zudem hat auch die Überexpression des mit 609 bp größten ORF keinen Einfluss auf die *MdCo31*-Expression. Es existieren folglich keine Hinweise, die auf eine *trans*-wirkende Regulation durch das Retrotransposon *Gypsy-44* hindeuten. Die positionsabhängige Regulation von *MdCo31* durch *Gypsy-44* bekräftigt stattdessen die Hypothese des Einflusses eines *cis*-regulierenden Elements.

## 5 Zusammenfassung

Trotz der Aufklärung des genetischen Hintergrundes sind die dem Kolumnarwachstum zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher weitestgehend unbekannt.

Die Transformation normalwüchsiger Individuen von *Malus x domestica* mit verschiedenen Vektor-Konstrukten sollte aufdecken, auf welche Weise die replikative Transposition des Ty3/Gypsy-Retrotransposons *Gypsy-44* die kolumnare Merkmalsausprägung hervorruft. Anhand der Charakterisierung erzeugter transgener Linien von *Malus x domestica* und *Nicotiana tabacum* konnte bestätigt werden, dass die Überexpression des Gens *MdCo31* hauptverantwortlich für die Ausprägung des kolumnaren Phänotyps ist (Wolters 2014; Okada et al. 2016).

Obwohl alle BLAST-Treffer mit hoher Sequenzübereinstimmung darauf hindeuten, dass das Gen *MdCo31* eine vermeintliche 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase kodiert (Wolters 2014; Okada et al. 2016), konnte ihm bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Die Beobachtung, dass kolumnare Individuen eindeutige Anzeichen eines GA-Mangels aufweisen und der ursprüngliche Phänotyp durch die Applikation bioaktiver GAs wiederhergestellt werden kann, deutet jedoch auf eine Rolle im Gibberellin-Stoffwechsel hin (Wolters 2014). Da die Überexpression Symptome eines GA-Mangels hervorruft, wird angenommen, dass *MdCo31* eine GA 2-Oxidase kodiert, welche die Metabolisierung bioaktiver GAs und ihre unmittelbaren Vorstufen katalysiert.

Anhand der transgenen Linien konnte zudem gezeigt werden, dass die der Überexpression zugrundeliegende replikative Transposition des LTR-Retrotransposons *Gypsy-44* dem Einfluss eines Positionseffekts unterliegt. Dies spricht gegen einen auf *Gypsy-44* lokalisierten Transkriptionsfaktor oder eine *trans*-wirkende ncRNA und deutet stattdessen auf die Regulierung durch ein *cis*-regulatorisches Element (CRE) hin. Entsprechend korrelierte auch die Erhöhung der Transkriptmenge des auf der kolumnar-spezifischen Kopie von *Gypsy-44* enthaltenen 609 bp großen ORFs nicht mit einer Erhöhung der Expression von *MdCo31*. Trotzdem zeigten transgene Linien mit erhöhter ORF-Transkription kolumnar-typische Merkmalsausprägungen. Inwieweit die Transkription des ORFs tatsächlich mit der Ausprägung des kolumnaren Phänotyps in Zusammenhang steht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## Webverzeichnis

FAO	<a href="http://www.fao.org/faostat">http://www.fao.org/faostat</a>
DESTATIS	<a href="https://www.destatis.de">https://www.destatis.de</a>
Statista	<a href="https://de.statista.com/">https://de.statista.com/</a>
USDA	<a href="https://www.usda.gov/">https://www.usda.gov/</a>
APHIS	<a href="https://www.aphis.usda.gov/aphis">https://www.aphis.usda.gov/aphis</a>
HC	<a href="https://www.canada.ca/en/health-canada.html">https://www.canada.ca/en/health-canada.html</a>

## Literaturverzeichnis

- Aldwinckle, H. S. (1977): Nature and Inheritance of Resistance to *Gymnosporangium juniperi-virginianae* in Apple Cultivars. In: *Phytopathology* 77 (2), S. 259. DOI: 10.1094/Phyto-67-259.
- Alston, F. H. (1970): Resistance to collar rot, *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet in Apple. In: *Report. East Malling Research Station*, S. 143–145.
- Alston, F. H. (1976): Dwarfing and lethal genes in apple progenies. In: *Euphytica* 25 (1), S. 505–514. DOI: 10.1007/BF00041585.
- Altpeter, F.; Springer, N. M.; Bartley, L. E.; Blechl, A. E.; Brutnell, T. P.; Citovsky, V. et al. (2016): Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. In: *The Plant Cell* 28 (7), S. 1510–1520. DOI: 10.1105/tpc.16.00196.
- Arasu, N. T. (1968): Spur-type sports in apples. In: *Report of East Malling Research Station 1967*, S. 113–119.
- Atmakuri, K.; Cascales, E.; Burton, O. T.; Banta, L. M.; Christie, P. J. (2007): *Agrobacterium* ParA/MinD-like VirC1 spatially coordinates early conjugative DNA transfer reactions. In: *The EMBO journal* 26 (10), S. 2540–2551. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601696.
- Baek, D.; Davis, C.; Ewing, B.; Gordon, D.; Green, P. (2007): Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters. In: *Genome research* 17 (2), S. 145–155. DOI: 10.1101/gr.5872707.
- Bailey, P.; Zhu, Y.; Fernández-Fernández, F.; Keulemans, J.; Brown, S.; Xu, K. (2012): Fine genetic mapping of the Co locus controlling columnar growth habit in apple. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 287 (5), S. 437–450. DOI: 10.1007/s00438-012-0689-5.
- Baldi, P.; Wolters, P. J.; Komjanc, M.; Viola, R.; Velasco, R.; Salvi, S. (2013): Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.). In: *Mol Breeding* 31 (2), S. 429–440. DOI: 10.1007/s11032-012-9800-1.
- Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K.; Roh, T.-Y.; Schones, D. E.; Wang, Z. et al. (2007): High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. In: *Cell* 129 (4), S. 823–837. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.009.
- Becker, L. (2016): Untersuchungen zur biolistischen Transformation beim Apfel. Hochschule Geisenheim University.
- Becker, M. M.; Wang, Z. (1989): Origin of ultraviolet damage in DNA. In: *Journal of Molecular Biology* 210 (3), S. 429–438. DOI: 10.1016/0022-2836(89)90120-4.
- Bejerano, G.; Lowe, C. B.; Ahituv, N.; King, B.; Siepel, A.; Salama, S. R. et al. (2006): A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. In: *Nature* 441 (7089), S. 87–90. DOI: 10.1038/nature04696.
- Bennetzen, J. L.; Wang, H. (2014): The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. In: *Annual review of plant biology* 65, S. 505–530. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035811.

- Bhattacharya, A.; Kourmpetli, S.; Ward, D. A.; St. Thomas, G.; Gong, F.; Powers, S. J. et al. (2012): Characterization of the fungal gibberellin desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. In: *Plant physiology* 160 (2), S. 837–845. DOI: 10.1104/pp.112.201756.
- Blazek, J. (1992): Segregation and general evaluation of spur type or compact growth habits in apples. In: *Acta Horticulturae* (317), S. 71–80. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.317.6.
- Botton, A.; Eccher, G.; Forcato, C.; Ferrarini, A.; Begheldo, M.; Zermiani, M. et al. (2011): Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. In: *Plant physiology* 155 (1), S. 185–208. DOI: 10.1104/pp.110.165779.
- Boulin, T.; Bessereau, J.-L. (2007): Mos1-mediated insertional mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nat Protoc* 2 (5), S. 1276–1287. DOI: 10.1038/nprot.2007.192.
- Boyle, A. P.; Davis, S.; Shulha, H. P.; Meltzer, P.; Margulies, E. H.; Weng, Z. et al. (2008): High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. In: *Cell* 132 (2), S. 311–322. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.014.
- Britten, R. J. (1996): Cases of ancient mobile element DNA insertions that now affect gene regulation. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 5 (1), S. 13–17. DOI: 10.1006/mpev.1996.0003.
- Broggini, G. A. L.; Wohner, T.; Fahrentrapp, J.; Kost, T. D.; Flachowsky, H.; Peil, A. et al. (2014): Engineering fire blight resistance into the apple cultivar 'Gala' using the FB\_MR5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus x robusta* 5. In: *Plant biotechnology journal* 12 (6), S. 728–733. DOI: 10.1111/pbi.12177.
- Brosius, J.; Gould, S. J. (1992): On "genomenclature". A comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other "junk DNA". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (22), S. 10706–10710.
- Busov, V. B. (2003): Activation Tagging of a Dominant Gibberellin Catabolism Gene (GA 2-oxidase) from Poplar That Regulates Tree Stature. In: *Plant physiology* 132 (3), S. 1283–1291. DOI: 10.1104/pp.103.020354.
- Butelli, E.; Licciardello, C.; Zhang, Y.; Liu, J.; Mackay, S.; Bailey, P. et al. (2012): Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. In: *The Plant Cell* 24 (3), S. 1242–1255. DOI: 10.1105/tpc.111.095232.
- Byrd, K.; Corces, V. G. (2003): Visualization of chromatin domains created by the gypsy insulator of *Drosophila*. In: *The Journal of cell biology* 162 (4), S. 565–574. DOI: 10.1083/jcb.200305013.
- Calenge, F.; Faure, A.; Goerre, M.; Gebhardt, C.; Van de Weg, W E; Parisi, L.; Durel, C-E (2004): Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis Reveals Both Broad-Spectrum and Isolate-Specific QTL for Scab Resistance in an Apple Progeny Challenged with Eight Isolates of *Venturia inaequalis*. In: *Phytopathology* 94 (4), S. 370–379. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.4.370.
- Cavalli, G.; Misteli, T. (2013): Functional implications of genome topology. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (3), S. 290–299. DOI: 10.1038/nsmb.2474.

- Cavrak, V. V.; Lettner, N.; Jamge, S.; Kosarewicz, A.; Bayer, L. M.; Mittelsten Scheid, O. (2014): How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. In: *PLoS genetics* 10 (1), e1004115. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004115.
- Chen, X.; Xu, H.; Yuan, P.; Fang, F.; Huss, M.I.; Vega, V. B. et al. (2008): Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. In: *Cell* 133 (6), S. 1106–1117. DOI: 10.1016/j.cell.2008.04.043.
- Chevreau, E.; Lespinasse, Y.; Gallet, M. (1985): Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: *Theoretical and Applied Genetics* (71), S. 268–277.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Christian, M.; Cermak, T.; Doyle, E. L.; Schmidt, C.; Zhang, F.; Hummel, A. et al. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. In: *Genetics* 186 (2), S. 757–761. DOI: 10.1534/genetics.110.120717.
- Christie, P. J.; Gordon, J. E. (2014): The Agrobacterium Ti Plasmids. In: *Microbiology spectrum* 2 (6). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013.
- Chuang, C. F.; Meyerowitz, E. M. (2000): Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9), S. 4985–4990. DOI: 10.1073/pnas.060034297.
- Chung, H.; Bogwitz, M.I R.; McCart, C.; Andrianopoulos, A.; Ffrench-Constant, R. H.; Batterham, P.; Daborn, P. J. (2007): Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. In: *Genetics* 175 (3), S. 1071–1077. DOI: 10.1534/genetics.106.066597.
- Chuong, E. B.; Elde, N. C.; Feschotte, C. (2017): Regulatory activities of transposable elements. From conflicts to benefits. In: *Nature reviews. Genetics* 18 (2), S. 71–86. DOI: 10.1038/nrg.2016.139.
- Cohen, C. J.; Lock, W. M.; Mager, D. L. (2009): Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. In: *Gene* 448 (2), S. 105–114. DOI: 10.1016/j.gene.2009.06.020.
- Cohen, C. J.; Rebollo, R.; Babovic, S.; Dai, E. L.; Robinson, W. P.; Mager, D. L. (2011): Placenta-specific expression of the interleukin-2 (IL-2) receptor beta subunit from an endogenous retroviral promoter. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (41), S. 35543–35552. DOI: 10.1074/jbc.M111.227637.
- Comet, I.; Savitskaya, E.; Schuettengruber, B.; Negre, N.; Lavrov, S.; Parshikov, A. et al. (2006): PRE-mediated bypass of two Su(Hw) insulators targets PcG proteins to a downstream promoter. In: *Developmental cell* 11 (1), S. 117–124. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.05.009.
- Comet, I.; Schuettengruber, B.; Sexton, T.; Cavalli, G. (2011): A chromatin insulator driving three-dimensional Polycomb response element (PRE) contacts and Polycomb association with the chromatin fiber. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (6), S. 2294–2299. DOI: 10.1073/pnas.1002059108.

- Conner, P. J.; Brown, S. K.; Weeden, N. F. (1995): Examination of Apple (*Malus domestica*) Fruit Quality and Tree and Fruit Morphology using Molecular Markers. In: *HortScience* 30 (4), S. 832.
- Conner, P. J.; Brown, S. K.; Weeden, N. F. (1997): Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122 (3), S. 350–359.
- Cornille, A.; Gladioux, P.; Smulders, M. J. M.; Roldan-Ruiz, I.; Laurens, F.; Le Cam, B. et al. (2012): New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. In: *PLoS genetics* 8 (5), e1002703. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002703.
- Cournac, A.; Plumbridge, J. (2013): DNA looping in prokaryotes. Experimental and theoretical approaches. In: *Journal of bacteriology* 195 (6), S. 1109–1119. DOI: 10.1128/JB.02038-12.
- Cruz, C.; Houseley, J. (2014): Endogenous RNA interference is driven by copy number. In: *eLife* 3, e01581. DOI: 10.7554/eLife.01581.
- Cuddapah, S.; Jothi, R.; Schones, D. E.; Roh, T.-Y.; Cui, K.; Zhao, K. (2009): Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. In: *Genome research* 19 (1), S. 24–32. DOI: 10.1101/gr.082800.108.
- Cui, H.; Fedoroff, N. V. (2002): Inducible DNA demethylation mediated by the maize Suppressor-mutator transposon-encoded TnpA protein. In: *The Plant Cell* 14 (11), S. 2883–2899.
- Dashek, W.; Harrison, M. (Hg.) (2006): Plant cell biology. Enfield, NH: Science Publ.
- Davuluri, R. V.; Suzuki, Y.; Sugano, S.; Plass, C.; Huang, T. H.-M. (2008): The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. In: *Trends in genetics : TIG* 24 (4), S. 167–177. DOI: 10.1016/j.tig.2008.01.008.
- Decourtye, L.; Lantin, B. (1969): Contribution a la connaissance de mutants spurs de pommier; heredite du caractere. In: *Les Annales de l'Amelioration des Plantes* (19), S. 227–238.
- Decourtye, L. (1967): Etude de quelques caracteres a controle genetique simple chez le pommier (*Malus* sp) et le poirier (*Pyrus communis*). In: *Les Annales de l'Amelioration des Plantes* (17), S. 243–266.
- Doring, H. P.; Starlinger, P. (1986): Molecular genetics of transposable elements in plants. In: *Annual review of genetics* 20, S. 175–200. DOI: 10.1146/annurev.ge.20.120186.001135.
- Doudna, J. A.; Charpentier, E. (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213), S. 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Eimert, K.; Rückert, F.-E.; Schröder, M.-B. (2012): Genetic diversity within and between seedstock populations of several German autochthonous provenances and conventionally propagated nursery material of blackthorn (*Prunus spinosa* L.). In: *Plant Syst Evol* 298 (3), S. 609–618. DOI: 10.1007/s00606-011-0570-8.

- Elefant, F. (2000): Targeted Recruitment of Histone Acetyltransferase Activity to a Locus Control Region. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (18), S. 13827–13834. DOI: 10.1074/jbc.275.18.13827.
- Engler-Blum, G.; Meier, M.; Frank, J.; Müller, G. A. (1993): Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. In: *Analytical biochemistry* 210 (2), S. 235–244.
- Espley, R. V.; Bovy, A.; Bava, C.; Jaeger, S. R.; Tomes, S.; Norling, C. et al. (2013): Analysis of genetically modified red-fleshed apples reveals effects on growth and consumer attributes. In: *Plant Biotechnol J* 11 (4), S. 408–419. DOI: 10.1111/pbi.12017.
- Evans, R.; Campbell, C. (2002): The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. In: *American journal of botany* 89 (9), S. 1478–1484. DOI: 10.3732/ajb.89.9.1478.
- Farrell, C. M.; West, A. G.; Felsenfeld, G. (2002): Conserved CTCF Insulator Elements Flank the Mouse and Human -Globin Loci. In: *Molecular and cellular biology* 22 (11), S. 3820–3831. DOI: 10.1128/MCB.22.11.3820-3831.2002.
- Feschotte, C. (2008): Transposable elements and the evolution of regulatory networks. In: *Nature reviews. Genetics* 9 (5), S. 397–405. DOI: 10.1038/nrg2337.
- Feschotte, C.; Pritham, E. J. (2007): DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. In: *Annual review of genetics* 41, S. 331–368. DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090448.
- Finnegan, D. J. (1989): Eukaryotic transposable elements and genome evolution. In: *Trends in Genetics* 5, S. 103–107. DOI: 10.1016/0168-9525(89)90039-5.
- Franchini, L. F.; Lopez-Leal, R.; Nasif, S.; Beati, P.; Gelman, D. M.; Low, M. J. et al. (2011): Convergent evolution of two mammalian neuronal enhancers by sequential exaptation of unrelated retroposons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (37), S. 15270–15275. DOI: 10.1073/pnas.1104997108.
- Fukazawa, J.; Sakai, T.; Ishida, S.; Yamaguchi, I.; Kamiya, Y.; Takahashi, Y. (2000): Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. In: *The Plant Cell* 12 (6), S. 901–915.
- Galinato, S; Gallardo, K; Miles, C (2014): 2013 Cost Estimation of Establishing a Cider Apple Orchard in Western Washington. In: *Washington State University Extension FS141E*.
- Gallardo, R; Taylor, M; Hinman, H (2010): 2009 Cost Estimates of Establishing and Producing Gala Apples in Washington. In: *Washington State University Extension Fatsheet FS005E*.
- Gan, S.; Xie, M. (2006): Genetic insulator for preventing influence by another gene promoter am 2006. Anmeldenr: US 11/328,226. Veröffentlichungsnr: US20060174370 A1.
- Gaszner, M.; Felsenfeld, G. (2006): Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. In: *Nature reviews. Genetics* 7 (9), S. 703–713. DOI: 10.1038/nrg1925.

- Gaut, B. S.; Wright, S. I.; Rizzon, C.; Dvorak, J.; Anderson, L. K. (2007): Recombination: an underappreciated factor in the evolution of plant genomes. In: *Nature reviews. Genetics* 8 (1), S. 77–84. DOI: 10.1038/nrg1970.
- Gdula, D. A.; Gerasimova, T. I.; Corces, V. G. (1996): Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9378–9383.
- Gerasimova, T. I.; Lei, E. P.; Bushey, A. M.; Corces, V. G. (2007): Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. In: *Molecular cell* 28 (5), S. 761–772. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.09.024.
- Geyer, P. K.; Corces, V. G. (1992): DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. In: *Genes & Development* 6 (10), S. 1865–1873. DOI: 10.1101/gad.6.10.1865.
- Gleave, A. P. (1992): A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. In: *Plant Mol Biol* 20 (6), S. 1203–1207. DOI: 10.1007/BF00028910.
- Gross, B. L.; Henk, A. D.; Richards, C. M.; Fazio, G.; Volk, G. M. (2014): Genetic diversity in *Malus domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. In: *American journal of botany* 101 (10), S. 1770–1779. DOI: 10.3732/ajb.1400297.
- Gründemann, D.; Schömig, E. (1996): Protection of DNA During Preparative Agarose Gel Electrophoresis Against Damage Induced by Ultraviolet Light. In: *BioTechniques* (21), S. 898–903.
- Hadjiargyrou, M.; Delihias, N. (2013): The intertwining of transposable elements and non-coding RNAs. In: *International journal of molecular sciences* 14 (7), S. 13307–13328. DOI: 10.3390/ijms140713307.
- Handoko, L.; Xu, H.; Li, G.; Ngan, C. Y.; Chew, E.; Schnapp, M. et al. (2011): CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. In: *Nat Genet* 43 (7), S. 630–638. DOI: 10.1038/ng.857.
- Harmston, N.; Lenhard, B. (2013): Chromatin and epigenetic features of long-range gene regulation. In: *Nucleic acids research* 41 (15), S. 7185–7199. DOI: 10.1093/nar/gkt499.
- Harris, S. A.; Robinson, J. P.; Juniper, B. E. (2002): Genetic clues to the origin of the apple. In: *Trends in Genetics* 18 (8), S. 426–430. DOI: 10.1016/S0168-9525(02)02689-6.
- Hashida, S.-N.; Uchiyama, T.; Martin, C.; Kishima, Y.; Sano, Y.; Mikami, T. (2006): The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. In: *The Plant Cell* 18 (1), S. 104–118. DOI: 10.1105/tpc.105.037655.
- Hatzis, P.; Talianidis, I. (2002): Dynamics of Enhancer-Promoter Communication during Differentiation-Induced Gene Activation. In: *Molecular cell* 10 (6), S. 1467–1477. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00786-4.
- Health Canada (2015): Novel Food Information - Arctic Apple Events GD743 and GS784. Fundstelle: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/arcappsci-eng.php>.
- Hedden, P.; Thomas, S. G. (2012): Gibberellin biosynthesis and its regulation. In: *The Biochemical journal* 444 (1), S. 11–25. DOI: 10.1042/BJ20120245.

- Helliwell, C. A.; Chandler, P. M.; Poole, A.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. (2001): The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (4), S. 2065–2070. DOI: 10.1073/pnas.98.4.2065.
- Hemmat, M; Weeden, N; Manganaris, A; Lawson, D (1994): Molecular Marker Linkage Map for Apple. In: *Journal of Heredity* (85), S. 4–11.
- Hemmat, M; Weeden, NF; Conner, PJ; Brown, SK (1997): A DNA Marker for Columnar Growth Habit in Apple Contains a Simple Sequence Repeat. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122 (3), S. 347–349.
- Hernandez-Garcia, C. M.; Finer, J. J. (2014): Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 217-218, S. 109–119. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.12.007.
- Hewetson, A.; Chilton, B. S. (2008): Progesterone-dependent deoxyribonucleic acid looping between RUSH/SMARCA3 and Egr-1 mediates repression by c-Rel. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (4), S. 813–822. DOI: 10.1210/me.2007-0432.
- Hily, J.-M.; Singer, S. D.; Yang, Y.; Liu, Z. (2009): A transformation booster sequence (TBS) from *Petunia hybrida* functions as an enhancer-blocking insulator in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell Rep* 28 (7), S. 1095–1104. DOI: 10.1007/s00299-009-0700-8.
- Ho, Y.; Elefant, F.; Liebhaber, S. A.; Cooke, N. E. (2006): Locus control region transcription plays an active role in long-range gene activation. In: *Molecular cell* 23 (3), S. 365–375. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.05.041.
- Hobbs, S. L.; Kpodar, P.; DeLong, C. M. O. (1990): The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. In: *Plant Mol Biol* 15 (6), S. 851–864. DOI: 10.1007/BF00039425.
- Hobbs, S. L.; Warkentin, T. D.; DeLong, C. M. (1993): Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. In: *Plant Mol Biol* 21 (1), S. 17–26.
- Hoen, D. R.; Bureau, T. E. (2012): Transposable Element Exaptation in Plants. In: Marie-Angèle Grandbastien und Josep M. Casacuberta (Hg.): *Plant Transposable Elements. Impact on Genome Structure and Function*, Bd. 24. Berlin, Heidelberg: Springer (Topics in Current Genetics, 24), S. 219–251.
- Holwerda, S.; Laat, W. de (2012): Chromatin loops, gene positioning, and gene expression. In: *Frontiers in genetics* 3, S. 217. DOI: 10.3389/fgene.2012.00217.
- Hood, E.; Gelvin, S.; Melchers, L.; Hoekema, A. (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants plants. In: *Transgenic research* (2), S. 208–218.
- Horike, S.-I.; Cai, S.; Miyano, M.; Cheng, J.-F.; Kohwi-Shigematsu, T. (2005): Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. In: *Nat Genet* 37 (1), S. 31–40. DOI: 10.1038/ng1491.
- Hsu, P.-Y.; Hsu, H.-K.; Singer, G. A. C.; Yan, P. S.; Rodriguez, B. A. T.; Liu, J. C. et al. (2010): Estrogen-mediated epigenetic repression of large chromosomal regions through DNA looping. In: *Genome research* 20 (6), S. 733–744. DOI: 10.1101/gr.101923.109.

- Huang, J.; Tang, D.; Shen, Y.; Qin, B.; Hong, L.; You, A. et al. (2010): Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Journal of Genetics and Genomics* 37 (1), S. 23–36. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60022-9.
- Hui, E. K.-W.; Wang, P.-C.; Lo, S. J. (1998): Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 54 (12), S. 1403–1411. DOI: 10.1007/s000180050262.
- Ito, H. (2012): Small RNAs and transposon silencing in plants. In: *Development, growth & differentiation* 54 (1), S. 100–107. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01309.x.
- James, D. J.; Passey, A. J.; Barbara, D. J.; Bevan, M. (1989): Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. In: *Plant cell reports* 7 (8), S. 658–661. DOI: 10.1007/BF00272054.
- Janick, J.; Moore, J. (Hg.) (1996): *Fruit Breeding, Tree and Tropical Fruits*: John Wiley & Sons, Inc.
- Jiang, N.; Bao, Z.; Zhang, X.; Eddy, S. R.; Wessler, S. R. (2004): Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. In: *Nature* 431 (7008), S. 569–573. DOI: 10.1038/nature02953.
- Jing, H.; Vakoc, C. R.; Ying, L.; Mandat, S.; Wang, H.; Zheng, X.; Blobel, G. A. (2008): Exchange of GATA factors mediates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus. In: *Molecular cell* 29 (2), S. 232–242. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.11.020.
- Jorgensen, R. A.; Cluster, P. D.; English, J.; Que, Q.; Napoli, C. A. (1996): Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. In: *Plant Mol Biol* 31 (5), S. 957–973.
- Josefsson, C.; Dilkes, B.; Comai, L. (2006): Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. In: *Current biology : CB* 16 (13), S. 1322–1328. DOI: 10.1016/j.cub.2006.05.045.
- Kadauke, S.; Blobel, G. A. (2009): Chromatin loops in gene regulation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1789 (1), S. 17–25. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.07.002.
- Kalendar, R.; Tanskanen, J.; Immonen, S.; Nevo, E.; Schulman, A. H. (2000): Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), S. 6603–6607. DOI: 10.1073/pnas.110587497.
- Kidwell, M. G. (2002): Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. In: *Genetica* 115 (1), S. 49–63. DOI: 10.1023/A:1016072014259.
- Kim, M. Y.; Song, K. J.; Hwang, J.-H.; Shin, Y.-U.; Lee, H. J. (2003): Development of RAPD and SCAR markers linked to the Co gene conferring columnar growth habit in apple (*Malus pumila* Mill.). In: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78 (4), S. 512–517. DOI: 10.1080/14620316.2003.11511656.
- Kim, S. W.; Li, Z.; Moore, P. S.; Monaghan, A. P.; Chang, Y.; Nichols, M.; John, B. (2010): A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. In: *Nucleic acids research* 38 (7), e98. DOI: 10.1093/nar/gkp1235.

- Kim, Y. G.; Cha, J.; Chandrasegaran, S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (3), 1156–1160.
- Kim, Y. W.; Lee, S.; Yun, J.; Kim, A. (2015): Chromatin looping and eRNA transcription precede the transcriptional activation of gene in the beta-globin locus. In: *Bioscience reports* 35 (2). DOI: 10.1042/BSR20140126.
- King, G. J.; Maliepaard, C.; Lynn, J. R.; Alston, F. H.; Durel, C. E.; Evans, K. M. et al. (2000): Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). In: *TAG Theoretical and Applied Genetics* 100 (7), S. 1074–1084. DOI: 10.1007/s001220051389.
- Kitagawa, N.; Washio, T.; Kosugi, S.; Yamashita, T.; Higashi, K.; Yanagawa, H. et al. (2005): Computational analysis suggests that alternative first exons are involved in tissue-specific transcription in rice (*Oryza sativa*). In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (9), S. 1758–1763. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti253.
- Klaver, B.; Berkhout, B. (1994): Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. In: *Journal of virology* 68 (6), S. 3830–3840.
- Kloeckener-Gruissem, B.; Freeling, M. (1995): Transposon-induced promoter scrambling: A mechanism for the evolution of new alleles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (6), S. 1836–1840.
- Kodama, Y.; Nagaya, S.; Shinmyo, A.; Kato, K. (2007): Mapping and characterization of DNase I hypersensitive sites in Arabidopsis chromatin. In: *Plant & cell physiology* 48 (3), S. 459–470. DOI: 10.1093/pcp/pcm017.
- Kohli, A.; Miro, B.; Twyman, R. M. (2010): Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: Chittaranjan Kole, Charles Michler, Albert G. Abbott und Timothy C. Hall (Hg.): *Transgenic Crop Plants 1. Volume 1: Principles and Development*. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 201–237.
- Koo, S. C.; Choi, M. S.; Chun, H. J.; Park, H. C.; Kang, C. H.; Shim, S. I. et al. (2009): Identification and characterization of alternative promoters of the rice MAP kinase gene OsBWMK1. In: *Molecules and cells* 27 (4), S. 467–473. DOI: 10.1007/s10059-009-0062-7.
- Krost, C.; Petersen, R.; Lokan, S.; Brauksiepe, B.; Braun, P.; Schmidt, E. R. (2013): Evaluation of the hormonal state of columnar apple trees (*Malus x domestica*) based on high throughput gene expression studies. In: *Plant Mol Biol* 81 (3), S. 211–220. DOI: 10.1007/s11103-012-9992-0.
- Krost, C.; Petersen, R.; Schmidt, E. R. (2012): The transcriptomes of columnar and standard type apple trees (*Malus x domestica*) - a comparative study. In: *Gene* 498 (2), S. 223–230. DOI: 10.1016/j.gene.2012.01.078.
- Krost, C.; Petersen, R.; Schmidt, E. R.; Braun, P. (2014): Deep sequencing of the shoot apical meristem transcriptome of columnar apple trees (*Malus x domestica*). In: *Acta Horticulturae* (1048), S. 103–106. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1048.11.
- Krysan, P. J. (1999): T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. In: *The Plant Cell* 11 (12), S. 2283–2290. DOI: 10.1105/tpc.11.12.2283.

- Ku, M. S.; Agarie, S.; Nomura, M.; Fukayama, H.; Tsuchida, H.; Ono, K. et al. (1999): High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. In: *Nature biotechnology* 17 (1), S. 76–80. DOI: 10.1038/5256.
- Kumar, A.; Bennetzen, J. L. (1999): Plant retrotransposons. In: *Annual review of genetics* 33, S. 479–532. DOI: 10.1146/annurev.genet.33.1.479.
- Kumar, S.; Fladung, M. (2000): Determination of transgene repeat formation and promoter methylation in transgenic plants. In: *BioTechniques* 28 (6), S. 1128.
- Kunarso, G.; Chia, N.-Y.; Jeyakani, J.; Hwang, C.; Lu, X.; Chan, Y.-S. et al. (2010): Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. In: *Nat Genet* 42 (7), S. 631–634. DOI: 10.1038/ng.600.
- Kung, S.-d.; Arntzen, C. J. (2014): *Plant Biotechnology*. Biotechnology. Burlington: Elsevier Science. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1879880>.
- Laat, W. de; Grosveld, F. (2003): Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. In: *Chromosome Research* 11 (5), S. 447–459. DOI: 10.1023/A:1024922626726.
- Lai, F.; Orom, U. A.; Cesaroni, M.; Beringer, M.; Taatjes, D. J.; Blobel, G. A.; Shiekhhattar, R. (2013): Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. In: *Nature* 494 (7438), S. 497–501. DOI: 10.1038/nature11884.
- Lapins, K.; Watkins, R. (1973): Genetics of compact growth. In: *Report of East Malling Research Station*, S. 136.
- Lapins, K. O. (1969): Segregation of compact growth types in certain apple seedling progenies. In: *Canadian Journal of Plant Science* 49 (6), S. 765–768. DOI: 10.4141/cjps69-130.
- Lapins, K. O. (1976): Inheritance of compact growth type in apple. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101 (2), S. 133–135.
- Lapins, K. O.; Fisher, D. V. (1974): Four natural spur-type mutants of McIntosh apple. In: *Canadian Journal of Plant Science* 54 (2), S. 359–362. DOI: 10.4141/cjps74-055.
- Laurens, F. (1998): Review of the current apple breeding programmes in the world. Objectives for scion cultivar improvement. In: *Acta Hortic.* (484), S. 163–170. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.484.26.
- Lawson, D.; Hemmat, M.; Weeden, N. (1995): The Use of Molecular Markers to Analyze the Inheritance of Morphological and Developmental Traits in Apple. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120 (3), S. 532–537.
- Li, J.; Yuan, R. (2008): NAA and Ethylene Regulate Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Perception, and Cell Wall Degradation During Fruit Abscission and Ripening in ‘Delicious’ Apples. In: *J Plant Growth Regul* 27 (3), S. 283–295. DOI: 10.1007/s00344-008-9055-6.
- Li, J.-F.; Norville, J. E.; Aach, J.; McCormack, M.; Zhang, D.; Bush, J. et al. (2013): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. In: *Nature biotechnology* 31 (8), S. 688–691. DOI: 10.1038/nbt.2654.

- Li, Q.; Peterson, K. R.; Fang, X.; Stamatoyannopoulos, G. (2002): Locus control regions. In: *Blood* 100 (9), S. 3077–3086. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1104.
- Liang, Z.; Zhang, K.; Chen, K.; Gao, C. (2014): Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. In: *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 41 (2), S. 63–68. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- Liebhart, R.; Kellerhals, M.; Pfammatter, W.; Jertmini, M.; Gessler, C. (2003): Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: *Plant molecular biology* 52 (3), S. 511–526. DOI: 10.1023/A:1024886500979.
- Lin, R.; Ding, L.; Casola, C.; Ripoll, D. R.; Feschotte, C.; Wang, H. (2007): Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854), S. 1302–1305. DOI: 10.1126/science.1146281.
- Lisch, D. (2009): Epigenetic regulation of transposable elements in plants. In: *Annual review of plant biology* 60, S. 43–66. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092744.
- Lisch, D. (2013): How important are transposons for plant evolution? In: *Nature reviews. Genetics* 14 (1), S. 49–61. DOI: 10.1038/nrg3374.
- Liu, T.; Zhang, J.; Zhou, T. (2016): Effect of Interaction between Chromatin Loops on Cell-to-Cell Variability in Gene Expression. In: *PLoS computational biology* 12 (5), e1004917. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004917.
- Lockton, S.; Gaut, B. S. (2009): The contribution of transposable elements to expressed coding sequence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of molecular evolution* 68 (1), S. 80–89. DOI: 10.1007/s00239-008-9190-5.
- Looney, N.; Lane, W (1984): Spur-type growth mutants of McIntosh apple: a review of their genetics, physiology and field performance. In: *Acta Horticulturae* (146), S. 31–46. DOI: 10.17660/ActaHortic.1984.146.2.
- Lozano-Juste, J.; Cutler, S. R. (2014): Plant genome engineering in full bloom. In: *Trends in Plant Science* 19 (5), S. 284–287. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.02.014.
- Lunyak, V. V.; Prefontaine, G. G.; Nunez, E.; Cramer, T.; Ju, B.-G.; Ohgi, K. A. et al. (2007): Developmentally regulated activation of a SINE B2 repeat as a domain boundary in organogenesis. In: *Science* 317 (5835), S. 248–251. DOI: 10.1126/science.1140871.
- Mao, Yanfei; Zhang, Hui; Xu, Nanfei; Zhang, Botao; Gou, Feng; Zhu, Jian-Kang (2013): Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. In: *Molecular plant* 6 (6), S. 2008–2011. DOI: 10.1093/mp/sst121.
- Mason, C. E.; Shu, F.-J.; Wang, C.; Session, R. M.; Kallen, R. G.; Sidell, N. et al. (2010): Location analysis for the estrogen receptor- $\alpha$  reveals binding to diverse ERE sequences and widespread binding within repetitive DNA elements. In: *Nucleic acids research* 38 (7), S. 2355–2368. DOI: 10.1093/nar/gkp1188.
- Mayerhofer, R.; Koncz-Kalman, Z.; Nawrath, C.; Bakkeren, G.; Cramer, A.; Angelis, K. et al. (1991): T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. In: *The EMBO journal* 10 (3), S. 697–704.
- McClintock, B (1948): Mutable loci in maize. In: *Carnegie Inst Wash Year Book* (47), S. 155–169.

- McClintock, B. (1956): Controlling Elements and the Gene. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21, S. 197–216. DOI: 10.1101/SQB.1956.021.01.017.
- McCue, A. D.; Nuthikattu, S.; Slotkin, R. K. (2013): Genome-wide identification of genes regulated in trans by transposable element small interfering RNAs. In: *RNA biology* 10 (8), S. 1379–1395. DOI: 10.4161/rna.25555.
- McCue, A. D.; Slotkin, R. K. (2012): Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. In: *Trends in genetics : TIG* 28 (12), S. 616–623. DOI: 10.1016/j.tig.2012.09.001.
- Method of the Year 2011. In: *Nature methods* 9 (1), S. 1.
- Micale, L.; Loviglio, M. N.; Manzoni, M.; Fusco, C.; Augello, B.; Migliavacca, E. et al. (2012): A fish-specific transposable element shapes the repertoire of p53 target genes in zebrafish. In: *PLoS one* 7 (10), e46642. DOI: 10.1371/journal.pone.0046642.
- Milot, E.; Strouboulis, J.; Trimborn, T.; Wijgerde, M.; Boer, E. de; Langeveld, A. et al. (1996): Heterochromatin Effects on the Frequency and Duration of LCR-Mediated Gene Transcription. In: *Cell* 87 (1), S. 105–114. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81327-6.
- Modolell, J.; Bender, W.; Meselson, M. (1983): *Drosophila melanogaster* mutations suppressible by the suppressor of Hairy-wing are insertions of a 7.3-kilobase mobile element. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (6), S. 1678–1682.
- Mora, A.; Sandve, G. K.; Gabrielsen, O. S.; Eskeland, R. (2016): In the loop. Promoter-enhancer interactions and bioinformatics. In: *Briefings in bioinformatics* 17 (6), S. 980–995. DOI: 10.1093/bib/bbv097.
- Moriya, S.; Iwanami, H.; Kotoda, N.; Takahashi, S.; Yamamoto, T.; Abe, K. (2009): Development of a Marker-assisted Selection System for Columnar Growth Habit in Apple Breeding. In: *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78 (3), S. 279–287. DOI: 10.2503/jjshs1.78.279.
- Moriya, S.; Okada, K.; Haji, T.; Yamamoto, T.; Abe, K. (2012): Fine mapping of Co, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus × domestica* Borkh.) linkage group 10. In: *Plant Breeding* 131 (5), S. 641–647. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2012.01985.x.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro. The Polymerase Chain Reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0), S. 263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Naito, K.; Cho, E.; Yang, G.; Campbell, M. A.; Yano, K.; Okumoto, Y. et al. (2006): Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (47), S. 17620–17625. DOI: 10.1073/pnas.0605421103.
- Naito, K.; Zhang, F.; Tsukiyama, T.; Saito, H.; Hancock, C. N.; Richardson, A. O. et al. (2009): Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. In: *Nature* 461 (7267), S. 1130–1134. DOI: 10.1038/nature08479.

Negi, P.; Rai, A. N.; Suprasanna, P. (2016): Moving through the Stressed Genome: Emerging Regulatory Roles for Transposons in Plant Stress Response. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 1448. DOI: 10.3389/fpls.2016.01448.

Noiton, D; Alspach, P (1996): Founding clones, inbreeding, coancestry and status number of modern apple cultivars. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (5), S. 773–782.

Nosaka, M.; Itoh, J.-I.; Nagato, Y.; Ono, A.; Ishiwata, A.; Sato, Y. (2012): Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. In: *PLoS genetics* 8 (9), e1002953. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002953.

Offringa, R.; Groot, M. J. de; Haagsman, H. J.; Does, M. P.; van den Elzen, P. J.; Hooykaas, P. J. (1990): Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after Agrobacterium mediated transformation. In: *The EMBO journal* 9 (10), S. 3077–3084.

Oikawa, T.; Koshioka, M.; Kojima, K.; Yoshida, H.; Kawata, M. (2004): A role of OsGA20ox1, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. In: *Plant Mol Biol* 55 (5), S. 687–700. DOI: 10.1007/s11103-004-1692-y.

Okada, K.; Wada, M.; Moriya, S.; Katayose, Y.; Fujisawa, H.; Wu, J. et al. (2016): Expression of a putative dioxygenase gene adjacent to an insertion mutation is involved in the short internodes of columnar apples (*Malus x domestica*). In: *Journal of plant research* 129 (6), S. 1109–1126. DOI: 10.1007/s10265-016-0863-7.

Ooms, G.; Hooykaas, P. J.; van Veen, R. J. M.; van Beelen, P.; Regensburg-Tuïnk, T. J. G.; Schilperoort, R. A. (1982): Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. In: *Plasmid* 7 (1), S. 15–29. DOI: 10.1016/0147-619X(82)90023-3.

Oraguzie, N; Iwanami, H; Soejima, J; Harada, T; Hall, A (2004): Inheritance of the Md-ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: *Theoretical and Applied Genetics* 108 (8), S. 1526–1533.

Ørom, U. A.; Derrien, T.; Beringer, M.; Gumireddy, K.; Gardini, A.; Bussotti, G. et al. (2010): Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. In: *Cell* 143 (1), S. 46–58. DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.001.

Otani, M.; Meguro, S.; Gondaira, H.; Hayashi, M.; Saito, M.; Han, D.-S. et al. (2013): Overexpression of the gibberellin 2-oxidase gene from *Torenia fournieri* induces dwarf phenotypes in the liliaceous monocotyledon *Tricyrtis* sp. In: *Journal of plant physiology* 170 (16), S. 1416–1423. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.05.002.

Oti, M.; Falck, J.; Huynen, M. A.; Zhou, H. (2016): CTCF-mediated chromatin loops enclose inducible gene regulatory domains. In: *BMC genomics* 17, S. 252. DOI: 10.1186/s12864-016-2516-6.

Otto, D. (2013): Molekulare Analyse des Kolumnar-Gens beim Apfel (*Malus x domestica*). Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Dissertation.

Otto, D.; Petersen, R.; Brauksiepe, B.; Braun, P.; Schmidt, E. R. (2014): The columnar mutation (“Co gene”) of apple (*Malus x domestica*) is associated with an integration of a Gypsy-like retrotransposon. In: *Mol Breeding* 33 (4), S. 863–880. DOI: 10.1007/s11032-013-0001-3.

- Palstra, R.-J.; Tolhuis, B.; Splinter, E.; Nijmeijer, R.; Grosveld, F.; Laats, W. de (2003): The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. In: *Nat Genet* 35 (2), S. 190–194. DOI: 10.1038/ng1244.
- pCambia vectors. Online verfügbar unter [http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html#dsy585\\_Description](http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html#dsy585_Description).
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, A.; Fischer, M. (2009): Breeding Apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: P. Priyadarshan, M. S. Mohan Jain (Hg.): *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*: Springer.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, A. M.; Díaz-Hernández, M. B. (2007): Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. In: *Genet Resour Crop Evol* 54 (2), S. 405–420. DOI: 10.1007/s10722-006-0003-7.
- Petersen, R. (2014): *Molecular Genetic Causes of Columnar Growth in Apple (Malus x domestica)*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Dissertation.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), 45e-45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Phillips, J. E.; Corces, V. G. (2009): CTCF. Master weaver of the genome. In: *Cell* 137 (7), S. 1194–1211. DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.001.
- Pi, W.; Zhu, X.; Wu, M.; Wang, Y.; Fulzele, S.; Eroglu, A. et al. (2010): Long-range function of an intergenic retrotransposon. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (29), S. 12992–12997. DOI: 10.1073/pnas.1004139107.
- Potter, D.; Eriksson, T.; Evans, R. C.; Oh, S.; Smedmark, J. E. E.; Morgan, D. R. et al. (2007): Phylogeny and classification of Rosaceae. In: *Plant Syst. Evol.* 266 (1-2), S. 5–43. DOI: 10.1007/s00606-007-0539-9.
- Pröls, F.; Meyer, P. (1992): The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. In: *Plant J* 2 (4), S. 465–475. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1992.t01-20-00999.x.
- Quinlan, J. D.; Tobutt, K. R. (1990): Manipulating Fruit Tree Structure Chemically and Genetically for Improved Performance. In: *HortScience* 25 (1), S. 60–64.
- Ran, Y.; Liang, Z.; Gao, C. (2017): Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. In: *Science China. Life sciences* 60 (5), S. 490–505. DOI: 10.1007/s11427-017-9022-1.
- Reinecke, D. M.; Wickramaratna, A. D.; Ozga, J. A.; Kurepin, L. V.; Jin, A. L.; Good, A. G.; Pharis, R. P. (2013): Gibberellin 3-oxidase gene expression patterns influence gibberellin biosynthesis, growth, and development in pea. In: *Plant physiology* 163 (2), S. 929–945. DOI: 10.1104/pp.113.225987.
- Reynolds, W. F.; Kumar, A. P.; Piedrafita, F. J. (2006): The human myeloperoxidase gene is regulated by LXR and PPAR $\alpha$  ligands. In: *Biochemical and biophysical research communications* 349 (2), S. 846–854. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.119.
- Roman, A. C.; Gonzalez-Rico, F. J.; Molto, E.; Hernando, H.; Neto, A.; Vicente-Garcia, C. et al. (2011): Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch. In: *Genome research* 21 (3), S. 422–432. DOI: 10.1101/gr.111203.110.

- Ross, J. J.; Murfet, I. C.; Reid, J. B. (1997): Gibberellin mutants. In: *Physiol Plant* 100 (3), S. 550–560. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03060.x.
- Sakamoto, T. (2001): Expression of a Gibberellin 2-Oxidase Gene around the Shoot Apex Is Related to Phase Transition in Rice. In: *Plant physiology* 125 (3), S. 1508–1516. DOI: 10.1104/pp.125.3.1508.
- Salvi, S.; Sponza, G.; Morgante, M.; Tomes, D.; Niu, X.; Fengler, K. A. et al. (2007): Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (27), S. 11376–11381. DOI: 10.1073/pnas.0704145104.
- Sampson, D; Cameron, R (1965): Inheritance of bronze foliage, extra petals and pendulous habit in ornamental crab apples. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (96), S. 717–722.
- Sandanayaka, W. R. M.; Bus, V. G. M.; Connolly, P.; Newcomb, R. (2003): Characteristics associated with Woolly Apple Aphid *Eriosoma lanigerum*, resistance of three apple rootstocks. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109 (1), S. 63–72. DOI: 10.1046/j.1570-7458.2003.00095.x.
- SanMiguel, P.; Gaut, B. S.; Tikhonov, A.; Nakajima, Y.; Bennetzen, J. L. (1998): The paleontology of intergene retrotransposons of maize. In: *Nat Genet* 20 (1), S. 43–45. DOI: 10.1038/1695.
- Sanyal, A.; Lajoie, B. R.; Jain, G.; Dekker, J. (2012): The long-range interaction landscape of gene promoters. In: *Nature* 489 (7414), S. 109–113. DOI: 10.1038/nature11279.
- Sasaki, T.; Nishihara, H.; Hirakawa, M.; Fujimura, K.; Tanaka, M.; Kokubo, N. et al. (2008): Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11), S. 4220–4225. DOI: 10.1073/pnas.0709398105.
- Sax, K. (1933): The origin of the Pomoideae. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (30), S. 147–150.
- Schmidt, G. W.; Delaney, S. K. (2010): Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 283 (3), S. 233–241. DOI: 10.1007/s00438-010-0511-1.
- Schubert, D.; Lechtenberg, B.; Forsbach, A.; Gils, M.; Bahadur, S.; Schmidt, R. (2004): Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. In: *The Plant Cell* 16 (10), S. 2561–2572. DOI: 10.1105/tpc.104.024547.
- Sessions, A.; Weigel, D.; Yanofsky, M. F. (1999): The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. In: *The Plant Journal* 20 (2), S. 259–263. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00594.x.
- Shiraki, T.; Kondo, S.; Katayama, S.; Waki, K.; Kasukawa, T.; Kawaji, H. et al. (2003): Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. In: *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 100 (26), S. 15776–15781. DOI: 10.1073/pnas.2136655100.
- Sinzelle, L.; Izsvak, Z.; Ivics, Z. (2009): Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (6), S. 1073–1093. DOI: 10.1007/s00018-009-8376-3.
- Slotkin, R. K.; Freeling, M.; Lisch, D. (2005): Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. In: *Nature genetics* 37 (6), S. 641–644. DOI: 10.1038/ng1576.
- Smith, P. A.; Corces, V. G. (1992): The suppressor of Hairy-wing binding region is required for gypsy mutagenesis. In: *Mol Gen Genet* 233 (1-2), S. 65–70.
- Souza, F. S. J. de; Franchini, L. F.; Rubinstein, M. (2013): Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong? In: *Molecular biology and evolution* 30 (6), S. 1239–1251. DOI: 10.1093/molbev/mst045.
- Splinter, E.; Laat, W. de (2011): The complex transcription regulatory landscape of our genome. Control in three dimensions. In: *The EMBO journal* 30 (21), S. 4345–4355. DOI: 10.1038/emboj.2011.344.
- Sponsel, V. M. (2016): Signal achievements in gibberellin research: the second half-century. In: Peter Hedden und Stephen Gregory Thomas (Hg.): Annual plant reviews. Volume 49: The gibberellins. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Stankiewicz-Kosyl, M.; Pitera, E.; Gawronski, S. W. (2005): Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211. In: *Plant Breeding* 124 (1), S. 63–66. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2004.01049.x.
- Stockhaus, J.; Eckes, P.; Blau, A.; Schell, J.; Willmitzer, L. (1987): Organ-specific and dosage-dependent expression of a leaf/stem specific gene from potato after tagging and transfer into potato and tobacco plants. In: *Nucl Acids Res* 15 (8), S. 3479–3491.
- Studer, A.; Zhao, Q.; Ross-Ibarra, J.; Doebley, J. (2011): Identification of a functional transposon insertion in the maize domestication gene *tb1*. In: *Nature genetics* 43 (11), S. 1160–1163. DOI: 10.1038/ng.942.
- Sun, T.-P. (2008): Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. In: *The Arabidopsis book* 6, e0103. DOI: 10.1199/tab.0103.
- Sverdlov, E. D. (2000): Retroviruses and primate evolution. In: *Bioessays* 22 (2), S. 161–171. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<161::AID-BIES7>3.0.CO;2-X.
- Svitashev, S.; Schwartz, C.; Lenderts, B.; Young, J. K.; Cigan, A. M. (2016): Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. In: *Nature communications* 7, S. 13274. DOI: 10.1038/ncomms13274.
- Swain, S. M.; Singh, D. P. (2005): Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. In: *Trends in Plant Science* 10 (3), S. 123–129. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.01.007.
- Taube, J. H.; Allton, K.; Duncan, S. A.; Shen, L.; Barton, M. C. (2010): *Foxa1* functions as a pioneer transcription factor at transposable elements to activate *Afp* during differentiation of embryonic stem cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (21), S. 16135–16144. DOI: 10.1074/jbc.M109.088096.

- Thangasamy, S.; Chen, P.-W.; Lai, M.-H.; Chen, J.; Jauh,.-Y. (2012): Rice LGD1 containing RNA binding activity affects growth and development through alternative promoters. In: *Plant J* 71 (2), S. 288–302. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04989.x.
- Tian, Y.-K.; Wang, C.-H.; Zhang, J.-S.; James, C.; Dai, H.-Y. (2005): Mapping Co, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers (145).
- Tien, D. N.; Oo, M. M.; Soh, M.-S.; Park, S. K. (2013): Bioengineering of Male Sterility in Rice (*Oryza sativa* L.). In: *Plant Breed. Biotech.* 1 (3), S. 218–235. DOI: 10.9787/PBB.2013.1.3.218.
- Tobutt, K. R. (1994): Combining apetalous parthenocarpy with columnar growth habit in apple. In: *Euphytica* 77 (1-2), S. 51–54. DOI: 10.1007/BF02551460.
- Tolhuis, B.; Palstra, R. J.; Splinter, E.; Grosveld, F.; Laats, W. de (2002): Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. In: *Molecular cell* 10 (6), S. 1453–1465.
- Travis, J. (2015): Making the cut. In: *Science (New York, N.Y.)* 350 (6267), S. 1456–1457. DOI: 10.1126/science.350.6267.1456.
- Trizzino, M.; Park, Y.; Holsbach-Beltrame, M.; Aracena, K.; Mika, K.; Caliskan, M. et al. (2016): Transposable element exaptation is the primary source of novelty in the primate gene regulatory landscape. DOI: 10.1101/083980.
- Tubbs, F. R. (1973): Research fields in the interaction of rootstocks and scions in woody perennials. In: *Horticultural Abstracts* (43), 247–253, 325–335.
- U.S. Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (2015): USDA Announces Deregulation of Non-Browning Apples. In: *Stakeholder Announcement*.
- Ulianov, S. V.; Gavrillov, A. A.; Razin, S. V. (2012): Spatial organization of the chicken beta-globin gene domain in erythroid cells of embryonic and adult lineages. In: *Epigenetics & chromatin* 5 (1), S. 16. DOI: 10.1186/1756-8935-5-16.
- Ungerer, M. C.; Strakosh, S. C.; Zhen, Y. (2006): Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation. In: *Current biology : CB* 16 (20), R872-3. DOI: 10.1016/j.cub.2006.09.020.
- Velasco, R.; Zharkikh, A.; Affourtit, J.; Dhingra, A.; Cestaro, A.; Kalyanaraman, A. et al. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: *Nature genetics* 42 (10), S. 833–839. DOI: 10.1038/ng.654.
- Volff, J.-N. (2006): Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28 (9), S. 913–922. DOI: 10.1002/bies.20452.
- Wallace, J. A.; Felsenfeld, G. (2007): We gather together. Insulators and genome organization. In: *Current opinion in genetics & development* 17 (5), S. 400–407. DOI: 10.1016/j.gde.2007.08.005.
- Wang, J.; Zhuang, J.; Iyer, S.; Lin, X.; Whitfield, T. W.; Greven, M. C. et al. (2012): Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. In: *Genome research* 22 (9), S. 1798–1812. DOI: 10.1101/gr.139105.112.

- Wang, Q.; Carroll, J. S.; Brown, M. (2005): Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. In: *Molecular cell* 19 (5), S. 631–642. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.07.018.
- Watanabe, M.; Bessho, H.; Suzuki, A.; Komori, S. (2008): Seasonal changes of IAA and cytokinin in shoots of columnar type apple trees. In: *Acta Horticulturae* (774), S. 75–80. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.774.8.
- Watanabe, M.; Suzuki, A.; Komori, S.; Bessho, H. (2004): Comparison of Endogenous IAA and Cytokinins in Shoots of Columnar and Normal Type Apple Trees. In: *Engei Gakkai zasshi* 73 (1), S. 19–24. DOI: 10.2503/jjshs.73.19.
- Waterhouse, P. M.; Graham, M. W.; Wang, M. B. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23), S. 13959–13964.
- Wei, W.; Brennan, M. D. (2000): Polarity of transcriptional enhancement revealed by an insulator element. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (26), S. 14518–14523. DOI: 10.1073/pnas.011529598.
- Wei, W.; Brennan, M. D. (2001): The gypsy insulator can act as a promoter-specific transcriptional stimulator. In: *Molecular and cellular biology* 21 (22), S. 7714–7720. DOI: 10.1128/MCB.21.22.7714-7720.2001.
- Westwood, M. N.; Zielinski, Q. B. (1966): Comparative growth habit and leaf composition of a compact mutant and standard Delicious apple. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (88), S. 9–13.
- White, S. E.; Habera, L. F.; Wessler, S. R. (1994): Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25), S. 11792–11796.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J. L.; Capy, P.; Chalhoub, B. et al. (2007): A unified classification system for eukaryotic transposable elements. In: *Nature reviews. Genetics* 8 (12), S. 973–982. DOI: 10.1038/nrg2165.
- Wicks, K.; Knight, J. C. (2011): Transcriptional repression and DNA looping associated with a novel regulatory element in the final exon of the lymphotoxin-beta gene. In: *Genes and immunity* 12 (2), S. 126–135. DOI: 10.1038/gene.2010.62.
- Wijgerde, M.; Grosveld, F.; Fraser, P. (1995): Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. In: *Nature* 377 (6546), S. 209–213. DOI: 10.1038/377209a0.
- Willoughby, D. A.; Vilalta, A.; Oshima, R. G. (2000): An Alu element from the K18 gene confers position-independent expression in transgenic mice. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2), S. 759–768.
- Wise, A.; Liu, Z.; Binns, A. (2006): Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium*. In: *Agrobacterium Protocols*, S. 43–54.
- Wit, I. de; Pauwels, E.; Keulemans, J. (2000): Different growth habits in apple and correlation between growth characteristics in progenies with a common Co-gene parent. In: *Acta Hortic.* (538), S. 325–330. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.538.56.

- Wit, I de; Cook, N; Keulemans, J (2004): Characterization of tree architecture in two-year-old apple seedling populations of different progenies with a common columnar gene parent. In: *Acta Hortic.* (663), S. 363–368. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.62.
- Wolters, P. J. (2014): Molecular aspects of columnar growth in apple. Wageningen: Wageningen University.
- Wolters, P. J.; Baldi, P; Schouten, H; Velasco, R; Si, A (2013a): Co gene MdCo31 of the 'Wijcik' mutant of *Malus x domestica* Borkh and plants with controlled tree architecture genetically transformed by introduction of this gene - European Patent Office am 10.01.2013. Anmeldenr: EP20130425004. Veröffentlichungsnr: EP2754711 A1.
- Wolters, P. J.; Schouten, H. J.; Velasco, R.; Si-Ammour, A.; Baldi, P. (2013b): Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase. In: *The New phytologist* 200 (4), S. 993–999. DOI: 10.1111/nph.12580.
- Wray, G. A.; Hahn, M. W.; Abouheif, E.; Balhoff, J. P.; Pizer, M.; Rockman, M. V.; Romano, L. A. (2003): The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. In: *Molecular biology and evolution* 20 (9), S. 1377–1419. DOI: 10.1093/molbev/msg140.
- Yan, Y.; Zhang, Y.; Yang, K.; Sun, Z.; Fu, Y.; Chen, X.; Fang, R. (2011): Small RNAs from MITE-derived stem-loop precursors regulate abscisic acid signaling and abiotic stress responses in rice. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65 (5), S. 820–828. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04467.x.
- Yao, J.-L.; Tomes, S.; Gleave, A. P. (2013): Transformation of apple (*Malus x domestica*) using mutants of apple acetolactate synthase as a selectable marker and analysis of the T-DNA integration sites. In: *Plant cell reports* 32 (5), S. 703–714. DOI: 10.1007/s00299-013-1404-7.
- Yoder, J. A.; Walsh, C. P.; Bestor, T. H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. In: *Trends in Genetics* 13 (8), S. 335–340. DOI: 10.1016/S0168-9525(97)01181-5.
- Yoon, Y. S.; Jeong, S.; Rong, Q.; Park, K.-Y.; Chung, J. H.; Pfeifer, K. (2007): Analysis of the H19ICR insulator. In: *Molecular and cellular biology* 27 (9), S. 3499–3510. DOI: 10.1128/MCB.02170-06.
- Yusufzai, T. M.; Tagami, H.; Nakatani, Y.; Felsenfeld, G. (2004): CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. In: *Molecular cell* 13 (2), S. 291–298.
- Zhang, W.; Wu, Y.; Schnable, J. C.; Zeng, Z.; Freeling, M.; Crawford, G. E.; Jiang, J. (2012a): High-resolution mapping of open chromatin in the rice genome. In: *Genome research* 22 (1), S. 151–162. DOI: 10.1101/gr.131342.111.
- Zhang, W.; Zhang, T.; Wu, Y.; Jiang, J. (2012b): Genome-wide identification of regulatory DNA elements and protein-binding footprints using signatures of open chromatin in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 24 (7), S. 2719–2731. DOI: 10.1105/tpc.112.098061.
- Zhang, Y.; Zhu, J.; Dai, H. (2012c): Characterization of Transcriptional Differences Between Columnar and Standard Apple Trees Using RNA-Seq. In: *Plant Mol Biol Rep* 30 (4), S. 957–965. DOI: 10.1007/s11105-011-0396-0.

Zhao, H.; Dean, A. (2004): An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. In: *Nucleic acids research* 32 (16), S. 4903–4919. DOI: 10.1093/nar/gkh832.

Zhu, S.; Gao, F.; Cao, X.; Chen, M.; Ye, G.; Wei, C.; Li, Y. (2005): The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. In: *Plant physiology* 139 (4), S. 1935–1945. DOI: 10.1104/pp.105.072306.

## Anhang

### Verwendete Lösungen

**Tabelle 28: Harnstoff-Puffer**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Harnstoff	420 g	7 M
NaCl [5 M]	62,5 ml	0,31 M
Tris-Cl, pH 8,0 [1 M]	50 ml	0,05 M
EDTA, pH 8,0 [0,5 M]	40 ml	0,02 M
Sarkosin [20 %]	50 ml	1 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

**Tabelle 29: Dialysepuffer [10x]**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
NaCl	175,32 g	3 M
Tris-HCL	30,285 g	0,25 M
Na <sub>2</sub> EDTA	37,224 g	0,1 M

**Tabelle 30: TBE-Puffer [10x]**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
TRIS Base	108 g	0,89 M
Borsäure	55 g	0,89 M
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	7,44 g	0,02 M
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	
pH-Wert = 8,0		

**Tabelle 31: MOPS-Puffer [10x]**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
MOPS [209,3 g/mol]	41,86 g	0,2 M
Natriumacetat, wasserfrei [82,04 g/mol]	4,1 g	50 mM
EDTA [372,24 g/mol]	3,7 g	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O [0,0001 %]	ad 1000 ml	
pH-Wert 7,0, Sterilfiltrieren, bei 4 °C dunkel lagern		

**Tabelle 32: Stop-Puffer [10x]**

Reagenzien	Endkonzentration
Glycerol	5,43 M
EDTA	0,1 M
TRIS-HCl	0,1 M
Bromphenolblau	3 mM

**Tabelle 33: 1,2%ige Formaldehyd-Gele**

Reagenzien	Pro 100 ml (8 Gele)	Endkonzentration
DEPC-H <sub>2</sub> O [0,0001 %]	75 ml	0,000075 %
MOPS-Puffer [10x] ( <b>Tabelle 31</b> )	10 ml	1x
Agarose	1,2 g	1,2 %
Formaldehydlösung [37 %]*	15 ml	5,55 %

\*Zugabe der Formaldehydlösung nach Lösen der Agarose und Abkühlen auf 60 °C

**Tabelle 34: GUS-Färbelösung (Sessions et al. 1999)**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Natriumphosphat-Puffer [100 mM], pH 7,0	500 ml	50 mM
Triton X-100	2 ml	0,2 %
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	422,39 mg	1 mM
Kaliumhexacyanoferrat (III)	329,25 mg	1 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	
Vor der Verwendung Zugabe von:		
x-GlcA [0,1 M]	10 ml	1 mM

**Tabelle 35: Denaturation-Solution**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
NaOH [39,997 g/mol]	20 g	0,5 M
NaCl [58,44 g/mol]	87,66 g	1,5 M

**Tabelle 36: Neutralization Solution**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 7,4 [2 M]	250 ml	0,5 M
NaCl [58,44 g/mol]	87,66 g	1,5 M
pH-Wert 7,5		

**Tabelle 37: SSC-Lösung [20x]**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
NaCl [58,44 g/mol]	175,3 g	3 M
Na <sub>3</sub> Citrate x 2 H <sub>2</sub> O [294,1 g/mol]	88,2 g	300 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	
pH-Wert 7,0		

**Tabelle 38: Post-Hyb-Wash-Solutions**

<b>Post-Hyb-Wash 1-Solution</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
20x SSC	100 ml	2x SSC
20 % SDS	5 ml	0,1 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>Post-Hyb-Wash 2-Solution</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
20x SSC	25 ml	0,5x SSC
20 % SDS	5 ml	0,1 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>Post-Hyb-Wash 3-Solution</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
20x SSC	5 ml	0,1x SSC
20 % SDS	5 ml	0,1 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

**Tabelle 39: Lösungen für die Plasmidpräparation nach Whitehead**

<b>Lösung I, pH 8,0</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O [372,24 g/mol]	3,72 g	10 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>Lösung II</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
NaOH [39,997 g/mol]	8 g	0,2 M
SDS	10 g	1 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>Lösung III, pH 5,2</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
Kaliumacetat [98,15 g/mol]	184 g	1,875 M
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>TE-Puffer, pH 8,0</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris [121,14 g/mol]	1,21 g	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O [372,24 g/mol]	18,6 g	50 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

<b>50T/50E-Puffer, pH 8,0</b>		
<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris [121,14 g/mol]	6 g	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O [372,24 g/mol]	18,6 g	50 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

## Verwendete Medien

### Stammlösungen

**Tabelle 40: MS Micro-Stammlösung [200x]**

<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Konzentration im Medium</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1,24 g	6,2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	4,46 g	22,3 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,72 g	8,6 mg/l
KI	166 mg	0,83 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	50 mg	0,25 mg/l
CuSO <sub>4</sub>	5 mg	25 µg/l
CoCl <sub>2</sub>	5 mg	25 µg/l
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

**Tabelle 41: MS Macro-/Micro-Stammlösung [20x]**

<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Konzentration im Medium</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33 g	1,65 g/l
KNO <sub>3</sub>	38 g	1,9 g/l
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	8,8 g	0,44 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4 g	0,17 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,4 g	0,37 g/l
dH <sub>2</sub> O	ad 900 ml	
MS Micro-Stammlösung [200x]	100 ml	1x

**Tabelle 42: B5 Vitamine [200x]**

<b>Reagenzien</b>	<b>Pro Liter</b>	<b>Konzentration im Medium</b>
Mio-Inositol	20 g	100 mg/l
Nicotinic Acid	0,2 g	1 mg/l
Pyridoxine	0,2 g	1 mg/l
Thiamine	2 g	10 mg/l
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

**Tabelle 43: HA Vitamine [1000x]**

Reagenzien	Pro Liter	Konzentration im Medium
Thiamine	0,8 g	0,8 mg/l
Pyridoxine	1 g	1 mg/l
Nicotinic Acid	1 g	1 mg/l
Glycine	4 g	4 mg/l
Biotin	80 mg	80 µg/l
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

## Pflanzenmedien

**Tabelle 44: Erhaltungsmedium #5**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Macro-/Micro-Stammlösung [20x]	50 ml	1x
Fe EDTA [8 g/l]	5 ml	40 g/l
B5 Vitamine [200x]	5 ml	1x
Saccharose	30 g	3 %
Bacto-Agar	7,5 g	0,75 %
BA [1 mg/ml]	1 ml	1 mg/l
IBA [1 mg/ml]	0,1 ml	0,1 mg/l
pH-Wert 5,9 - 6,0		

### Ergänzung für Erhaltungskultur transgener Sprosse (→ #5 KC bzw. #5 HC):

Cefotaxim [100 mg/l] (in #5 HC/KC)	1 ml	100 mg/l
Hygromycin [10 mg/l] (in #5 HC)	1 ml	10 mg/l
Kanamycin [50 mg/l] (in #5 KC)	2 ml	100 mg/l

**Tabelle 45: Erhaltungsmedium #5 Pc3 (für 'Procats 28')**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Macro-/Micro-Stammlösung [20x]	50 ml	1x
Fe EDTA [8 g/l]	5 ml	40 g/l
B5 Vitamine [200x]	5 ml	1x
Saccharose	30 g	3 %
Bacto-Agar	7,5 g	0,75 %
BA [1 mg/ml]	0,25 ml	0,25 mg/l
IBA [1 mg/ml]	0,1 ml	0,1 mg/l
pH-Wert 5,9 - 6,0		

**Tabelle 46: Vermehrungsmedium HA1**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Macro-/Micro-Stammlösung [20x]	50 ml	1x
Fe EDTA [8 g/l]	5 ml	40 g/l
HA Vitamine [1000x]	1 ml	1x
Myo-Inositol	100 mg	100 mg/l
Saccharose	30 g	3 %
Bacto-Agar	7,5 g	0,75 %
NAA [1 mg/ml]		
BAP [1 mg/ml]		
Kinetin [1 mg/ml]		
pH-Wert 5,9 - 6,0		

**Tabelle 47: Medium HA2 zur Ausbildung transformationsfähiger Blätter**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Macro-/Micro-Stammlösung [20x]	50 ml	1x
Fe EDTA [8 g/l]	5 ml	40 g/l
HA Vitamine [1000x]	1 ml	1x
Myo-Inositol	100 mg	100 mg/l
Saccharose	30 g	3 %
Bacto-Agar	7,5 g	0,75 %
NAA [1 mg/ml]		
2iP [1 mg/ml]		
pH-Wert 5,9 - 6,0		

**Tabelle 48: Regenerations-/Selektionsmedium #53**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Macro-/Micro-Stammlösung [20x]	50 ml	1x
Fe EDTA [8 g/l]	5 ml	40 g/l
B5 Vitamine [200x]	5 ml	1x
Sorbitol	40 g	4 %
Phytigel	2,5 g	0,25 %
BA [1 mg/ml]		
NAA [1 mg/ml]		
TDZ [1 mg/ml]		
pH-Wert 5,9 - 6,0		

**Ergänzung für die Selektion transgener Sprosse (→ #53 KC bzw. #53 HC):**

Cefotaxim [100 mg/l] (in #53 HC/KC)	1 ml	100 mg/l
Hygromycin [10 mg/l] (in #53 HC)	1 ml	10 mg/l
Kanamycin [50 mg/l] (in #53 KC)	2 ml	100 mg/l

**Tabelle 49: Erhaltungsmedium für *Nicotiana tabacum***

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
MS-Fertigmedium	4,41 g	
Saccharose	20 g	2 %
Bacto-Agar	9 g	0,9 %
pH-Wert 5,5		

**Ergänzung für die Erhaltungskultur transgener Linien**

Cefotaxim [100 mg/l]	1 ml	100 mg/l
Kanamycin [50 mg/l]	2 ml	100 mg/l

**Tabelle 50: Regenerations-/Selektionsmedium für *Nicotiana tabacum***

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
MS-Fertigmedium	4,41 g	
Saccharose	5 g	0,5 %
Gelrite	2,5 g	0,25 %
BAP [1 mg/ml]	1,126 ml	5 µM
IAA [1 mg/ml]	87,6 ml	0,5 µM
pH-Wert 6,0		

**Ergänzung für die Selektion transgener Sprosse**

Cefotaxim [100 mg/l]	1 ml	100 mg/l
Kanamycin [50 mg/l]	2 ml	100 mg/l

**Bakterienmedien****Tabelle 51: YM-Festmedium**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Yeast extract	0,4 g	0,04 %
Mannitol [182,172 g/mol]	10 g	54,9 mM
NaCl [58,44 g/mol]	0,1 g	1,7 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O [246,475 g/mol]	0,2 g	0,8 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [174,2 g/mol]	0,5 g	2,87 mM
Bacto-Agar	15 g	1,5 %
pH-Wert 7,0		

**Tabelle 52: YEP-Flüssigmedium**

Reagenzien	Pro Liter	Endkonzentration
Yeast extract	10 g	1 %
Pepton	10 g	1 %
NaCl [58,44 g/mol]	5 g	85,56 mM
pH-Wert 7,0		

**Tabelle 53: LB-Flüssig- bzw. Festmedium**

Reagenzien	Pro Liter
LB-Medium (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	25 g
<b>Zugabe für Festmedium:</b>	
Bacto-Agar	15 g (1,5 %)

**Tabelle 54: MGL-Flüssigmedium**

Reagenzien	Pro Liter
Trypton	5 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl [58,44 g/mol]	5 g
Mannitol [182,172 g/mol]	5 g
Glatamic acid [147,13 g/mol]	1,16 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [174,2 g/mol]	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O [246,475 g/mol]	0,1 g
Biotin [244,31 g/mol]	0,02 g
pH-Wert 7,0	

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Bezugsquellen erworben:

- AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Promega, Madison, USA
- Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Takara Bio Inc., Shiga, Japan
- Analytik Jena, Jena, Deutschland
- Applied Biosystems, Foster City, USA
- BioRad, Hercules, USA
- New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem, Niederlande

**Tabelle 55: Für die qPCR verwendete Primer**

Bezeichnung	Sequenz
MdActin_for	TGA CCG AAT GAG CAA GGA AAT TAC T
MdActin_rev	TAC TCA GCT TTG GCA ATC CAC ATC
Md_Dehyd02_for ( <i>Md_4592:1:a</i> )	TGG GAC CCC AGA AGC AAT AA
Md_Dehyd02_rev ( <i>Md_4592:1:a</i> )	CAT CGA GTC CTA ATG GCG CT
MdCo31_Exon2_for	CAA CTT CTT GCA AAC CCC ATG A
MdCo31_Exon1_rev	AGT TGA TCT TGG CAG CCG TG
qPCR_Gy44_for2	CAT TGG TCG GGT GGT GCT T
qPCR_Gy44_rev2	TCG GAG GTT TGT GGG TTT GT
Ntubc2_for	CTG GAC AGC AGA CTG ACA TC
Ntubc2_rev	CAG GAT AAT TTG CTG TAA CAG ATT A
NtEF-1a_for	TGA GAT GCA CCA CGA AGC TC
NtEF-1a_rev	CCA ACA TTG TCA CCA GGA AGT G

## Für den Southern Blot verwendete Sonden

### MdCo31-Sonde

AATGGTGCCCGTAACTTTTCGGTAGAGCGGACGGCCAATACTCAACTTCAAGGAAT  
 CTCACCCATGCGCGCCGGCGGGGAACCGGAGTTCCTTCAGTGAACGTTATTAG  
 TTCGCCGCTCGGTGTGTCGTAGATACTAGCCCCTGGGGCCTTTTCAAATTTGAAT  
 AAGATTTATGTAATCAGTCTTTTAGGTTTGACCGGTTCTGCCGCTTTTTTTAAAATT  
 GGATTTGTAATAATAAAAACGCAATTGTTTGTTATTGTGGCGCTCTATCATAGATGT  
 CGCTATAAACCTATTCAGCACAATATATTGTTTTTCATTTTAATATTGTACATATAAG  
 TAGTAGGGTACAATCAGTAAATTGAACGGAGAATATTATTCATAAAAATACGATAG  
 TAACGGGTGATATATTCATTAGAATGAACCGAAACCGGCGGTAAGGATCTGAGCT  
 ACACATGCTCAGGTTTTTTACAACGTGCACAACAGAATTGAAAGCAAATATCATGC  
 GATCATAGGCGTCTCGCATATCTCATTAAAGCAGGACTCTAGAGGATCCAAGCTT  
 ATCGATTTCGAACCCGGGGTACCTTAGCTACTCGAGAGGCTTAAAACCTTCGACA  
 TTTCTTCGTCGTTGGCAGCTTTTCGATTTGAAGTGTTGAAGGAACTCCGTAACTTC  
 ATGGATCTGTACAGTGGTGGATTGCACAAAACATTTGCAGGTTCTATAACGGTCT  
 CATTAGACGGATAAATGAAGTACGCAATCGTTGTCCTTGC

GUS P-Sonde

CTGCCATTCGAAGCGGAAATCAACAACCTCGCTGCGTGATGGCATGAATCGCGTC  
ACCGTCGCCGTGGACAACATCCTCGACGATAGCACCTCCCGGTGGGGCTGTAC  
AGCGAGCGCCACGAAGAGGGCCTCGGAAAAGTCATTCGTAACAAGCCGAACTTC  
GACTTCTTCAACTATGCAGGCCTGCACCGTCCGGTGAAAATCTACACGACCCCGT  
TTACGTACGTGAGGACATCTCGGTTGTGACCGACTTCAATGGCCCAACCGGGA  
CTGTGACCTATACGGTGGACTTTCAAGGCAAAGCCGAGACCGTGAAAGTGTCCG  
TCGTGGATGAGGAAGGCAAAGTGGTTCGCAAGCACCGAGGGCCTGAGCGGTAAC  
GTGGAGATTCCGAATGTCATCCTCTGGGAACCACTGAACACGTATCTCTACCAGA  
TCAAAGTGGAAGTGGTGAACGACGGACTGACCATCGATGTCTATGAAGAGCCGT  
TCGGCGTGCGGACCGTGGAAAGTCAACGACGGCAAGTTCCTCATCAACAACAAAC  
CGTTCTACTTCAAGGGCTTTGGCAAACATGAGGACACTCCTATCAACGGCCCGTGG  
CTTTAACGAAGCGAGCAATGTGATGGATTTCAATATCCTCAAATGGATCGGCGCC  
AACAGCTTCCGGACCGCACACTATCCGTACTCTGAAGAGTTGATGCGTCTTGCG  
GAT

Hygromycin-Sonde

ATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATAC  
GCCCCGAGTCGTGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG  
CGTCTGCTGCTCCATACAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGAC  
CTCGTATTGGGAATCCCCGAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATG  
CGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGC  
CGGACTTCGGGGCAGTCCTCGGCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGC  
GACGGACGCACTGACGGTGTGTCGTCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGG  
ATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCTTGC  
GGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGC  
ATCCATAGCCTCCGCGACCGGTTGTAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTCAGGCAG  
GTCTTGCAACGTGACACCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAGGCTCTC  
GCTAAACTCCCCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCGGCCGATGCAAA  
GTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATCGGCCGAGCTATTTAC

# Lebenslauf



## **Danksagung**

## Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen und Material) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als vorgelegte Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

-----  
(Ort, Datum)

-----  
(Uwe Schwan)