# Posttranskriptionale Geninaktivierung der α-Gliadine in Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Anne-Christine Folck aus Hamburg

> > Hamburg, 2004

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. LÖRZ Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 23. Januar 2004

Hamburg, den 07. Januar 2004



Professor Dr. A. Frühwald Dekan

Inhal	tsverzeichnis	Ι
Abkü	rzungsverzeichnis	III
Einhe	iten	IV
1.	Einleitung	1
1.1	Speicherproteine des Weizens	1
1.1.1	Polymere Prolamine	2
1.1.2	Monomere Prolamine	5
1.2	Zöliakie	8
1.3	Gentechnische Ansätze zur Geninaktivierung	10
1.4	Ziel der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	18
2.2	Pflanzengenotyp und Anzuchtbedingungen	18
2.3	Plasmide	18
2.4	Oligonukleotide	20
2.5	Transformation von Weizen	21
2.6	Molekularbiologische Arbeiten	21
2.6.1	Amplifikation der $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz	21
2.6.2	Markierung von DNA-Fragmenten	21
2.6.3	Isolierung genomischer DNA	22
2.6.4	Southern Blot-Analyse	22
2.6.5	Isolierung von Gesamt-RNA	22
2.6.6	Northern Blot-Analyse	23
2.6.7	RT-PCR	23
2.7	Proteinanalytik	23
2.7.1	Proteinextraktion	23
2.7.2	SDS-PAGE	24
2.7.3	Reversed-Phased High-Performance Liquid Chromatography	24

3.	Ergebnisse	25
3.1	Auswahl der α-Gliadin-Sequenz	25
3.2	Klonierung der Transformationsvektoren	29
3.3	Transformation von Weizen	31
3.4	Integration der GliaRNAi-Konstrukte in T <sub>0</sub> -Pflanzen	32
3.4.1	Nachweis des GliaRNAi-Spacer-Gens	32
3.4.2	Nachweis des GliaRNAi-Intron-Gens	33
3.4.3	Nachweis des GliaRNAi-OU-Gens	35
3.5.	Transkription der GliaRNAi-Konstrukte in T <sub>0</sub> -Pflanzen	35
3.5.1	RT-PCR-Analyse von GliaRNAi-T <sub>0</sub> -Pflanzen	36
3.5.2	Northern Blot-Analyse von GliaRNAi-Spacer-T <sub>0</sub> -Pflanzen	37
3.6.	Vererbung des GliaRNAi-Spacer-Transgens	38
3.7	Untersuchungen zur Reduktion der $\alpha$ -Gliadine	40
3.7.1	RP-HPLC-Analysen	40
3.7.2	SDS-PAGE-Untersuchungen	45
3.8	Proteinbestimmung	50
3.9	Effizienz der α-Gliadin-Geninaktivierung	51
4.	Diskussion	54
4.1	Transformation von Weizen	54
4.2	Konstruktdesign und Effizienz der $\alpha$ -Gliadin-Geninaktivierung	55
4.3	Auswahl der Zielsequenz	61
4.4	Vererbung und Stabilität des Phänotyps	62
4.5	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Anhang	68
6.1	Vergleich von 18 GenBank α-Gliadin-Sequenzen	68
6.2	Anteil der Proteine in der $\alpha$ -Gliadin enthaltenden Fraktion	72
7.	Literaturverzeichnis	74

# Abkürzungsverzeichnis:

А	Adenosin
С	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CSPD®	3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.1. <sup>3,7</sup> ] decan}-
	4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
dap	days after pollination
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
G	Guanosin
GFP	green fluorescent protein
GUS	<i>E. coli</i> $\beta$ -Glucuronidase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Р	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed-Phased High-Performance Liquid Chromatography
RT	reverse Transkription
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
Т	Thymidin
$T_0$	direktes transgenes Regenerat
$T_1$	aus Selbstung der $T_0$ entstandene Generation
$T_2$	aus Selbstung der $T_1$ entstandene Generation
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
UTR	untranslated region
Y	Tyrosin

# Einheiten:

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
nt	Nukleotid
h	Stunde
Da	Dalton
М	molar
min	Minute
lx	Lux
U	Unit
d	Tag

Alle Maßeinheiten wurden nach dem SI-System "Systeme International d'Unites, 1969" abgekürzt.

# 1. Einleitung

# **1.1** Speicherproteine des Weizens

Die rheologischen Eigenschaften von Teig aus Weizenmehl sind einzigartig unter den zur Herstellung von Brot- und Teigwaren verwendeten Pflanzen. Aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit gehören die Speicherproteine des Weizenendosperms zu den ersten Proteinen, die untersucht wurden. So stammt der erste Bericht über die Isolierung von Gluten, ein Gemisch von Speicherproteinen, das sich nach dem Anteigen bildet, von Becarri aus dem Jahr 1745. Die erste systematische Untersuchung der Speicherproteine, verbunden mit der Entwicklung einer Einteilung aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln, geht auf die Arbeiten von Osborne (1907) zurück.

Im natürlichen System dienen die Speicherproteine des Endosperms als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelspeicher. Die Proteine werden während der Keimung mobilisiert und dem wachsenden Keimling zugeführt.

Die Expression der Prolamine findet gewebespezifisch im mittleren bis späten Entwicklungsstadium des starchy Endosperms statt. Sie ist abhängig von der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen bzw. der Verfügbarkeit von Stickstoff und Schwefel in der Karyopse. Die Kontrolle der Expression erfolgt primär auf der Transkriptionsebene.

Als wichtige Regulationseinheit in der Promotorregion der schwefelreichen und schwefelarmen Prolamine von Weizen, Gerste und Roggen wurde bisher nur das N-Motiv (oder Stickstoff-Element) identifiziert. Das N-Motiv und das Endosperm-Motiv (oder E-Motiv) bilden zusammen die konservierte Prolaminbox (Hammond-Kosak *et al.*, 1993; Müller und Knudsen, 1993; Forde *et al.*, 1985).

Das N-terminale Signalpeptid der Prolamine sorgt für die Zielsteuerung der Proteine. Im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) erfolgen die Proteinfaltung und die Herstellung der Disulfidbindungen. Abhängig vom Proteintyp, vermutlich aber auch in Abhängigkeit von Alter und Entwicklungsstadium des Gewebes, wird ein Teil der Proteine über den Golgi-Apparat in die Vakuole transportiert und bildet hier Proteinaggregate. Der andere Teil aggregiert vermutlich bereits im Lumen des ER. Während der Karyopsenreifung kommt es dann zur Auflösung der Zellen im Endosperm, die Proteinaggregate fusionieren und formen eine kontinuierliche Matrix um die Stärke-Granula herum (zur Übersicht: Shewry *et al.*, 1995; Shewry und Halford, 2002). Der Gesamtproteingehalt von Getreidekaryopsen liegt im Durchschnitt bei 10-12% des Trockengewichtes. Der Anteil der Speicherproteine daran beträgt 70-80%. Die Hauptgruppe der Endosperm-Speicherproteine im Weizen bilden wie in fast allen Getreiden die Prolamine. Ausnahme sind Hafer und Reis, in denen 11/12S Speicherglobuline 70-80% des Gesamtproteingehaltes ausmachen. Namens gebend für die Prolamine war der hohe Anteil von Glutamin und Prolin in der Zusammensetzung der Aminosäuren. Die Einteilung der Prolamine in High Molecular Weight (HMW), schwefelreich oder schwefelarm beruht auf strukturellen Unterschieden und der auseinander laufenden evolutionären Entwicklung (Tab. 1). Zu den schwefelreichen Prolaminen gehören die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadine sowie die Low Molecular Weight (LMW)-Glutenine Typ B und C, während die ω-Gliadine und die LMW-Glutenine Typ D zu den schwefelarmen Prolaminen gehören. Vor dem Hintergrund der Funktionalität der Prolamine ist ebenfalls eine Einteilung in monomere Proteine ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -, und ω-Gliadine und LMW-Glutenine Typ D) und polymere Proteine (HMW-Glutenine und LMW-Glutenine Typ B und C) gebräuchlich (zur Übersicht: Shewry und Halford, 2002; Gianibelli et al., 2001). Die HMW- und LMW-Glutenine bilden durch intermolekulare Disulfidbindungen hochmolekulare Aggregate mit mehreren Millionen Dalton Größe.

Komponenten	Mono- oder Polymere	M <sub>r</sub> (Anteil in %)	Aminosäurezusammensetzung (mol %)
HMW Prolamine			
HMW-Glutenine	Polymere	65-90 000 (6-10%)	30-35% Gln, 10-16% Pro, 15-20% Gly, 0,5–1,5% Cys, 0,7-1,4% Lys
Schwefelreiche Prolamine			
γ-Gliadine	Monomere	30-45 000 (70-80%)	30-40% Gln, 15-20% Pro, 2-3% Cys, <1,0% Lys
α-Gliadine	Monomere		
Typ B und C LMW-Glutenine	Polymere		
Schwefelarme Prolamine			
ω-Gliadine	Monomere	30-75 000 (10-20%)	40-50% Gln, 20-30% Pro, 8-9% Phe,
Typ D LMW-Glutenine	Monomere		0-0,5% Lys, <0,5% Cys <sup>1</sup>

Tabelle 1: Einteilung der Weizenprolamine nach Shewry und Halford, 2002

# **1.1.1 Polymere Prolamine**

Die HMW-Glutenine sind die am besten charakterisierten Speicherproteine, obwohl ihr Anteil an den Prolaminen mit 6-10% eher gering ist. Für die Backqualität von Weizen sind die HMW-Glutenine von entscheidender Bedeutung, da sie bei der Teigbildung maßgeblich zur Elastizität des Teiges beitragen.

Im hexaploiden Weizen codieren die *Glu-1*-Loci auf dem langen Arm der homologen Chromosomen 1 des A-, B- und D-Genoms die HMW-Gluteninuntereinheiten (GS) (Bietz

*et al.*, 1975; Payne *et al.*, 1980, 1984, 1987). Dementsprechend werden diese Loci *Glu-A1*, *Glu-B1* und *Glu-D1* genannt. Von diesen werden jeweils zwei verschiedene HMW-GS-Gene exprimiert, die als x- und y-Untereinheit bezeichnet werden (Payne *et al.*, 1981, 1987; Shewry *et al.*, 1992). Diese Gene enthalten wie die der übrigen Prolamine keine Introns.

Der x-Typ HMW-GS besitzt eine geringere Mobilität in der SDS-PAGE und ein größeres Molekulargewicht als der y-Typ. Die Bezeichnung richtet sich nach der chromosomalen Lokalisierung, zum Beispiel als 1Ax und 1Ay (Chromosom 1A). Sowohl in hexaploidem Brotweizen (Lawrence und Shepherd, 1980; Payne *et al.*, 1980) als auch in tetraploidem Hartweizen (Branlard *et al.*, 1989; Waines und Payne, 1987) existieren Allele für die verschiedenen Loci. Für den *Glu-1A*-Locus wird von drei, für den *Glu-1B* von elf und für den *Glu-1D* von sechs Allelen berichtet (Payne und Lawrence, 1983).

Belegt ist dieser Polymorphismus auch für verschiedene Wildformen wie *Aegilops* (Fernandez-Calvin und Orellana, 1990), *T. tauschii* (Lagudah und Halloran, 1988; Williams *et al.*, 1993) sowie für Einkorn und Emmer Spezies (Waines und Payne, 1987; Ciaffi *et al.*, 1993, 1998; Nevo und Payne, 1987).

Von den sechs Allelen in hexaploidem Weizen werden in den meisten angebauten Kulturweizenarten jedoch nur drei bis fünf exprimiert, dazu gehören immer die Untereinheiten 1Bx, 1Dx und 1Dy.

Der Einfluss der verschiedenen HMW-GS-Allele bzw. der HMW-GS-Zusammensetzung in verschiedenen Weizenkultivaren auf die Teigbildungseigenschaften ist schon lange bekannt und wurde vielfach gezeigt. So korrelieren beispielsweise die Allele 1Dx5+1Dx10 des *Glu-D1* mit einer guten Backqualität und einem starken, festen Teig, während die Expression der Allele 1Dx2+1Dx12 zu einem Teig mit weniger guten Teigbildungseigenschaften führt (Payne, 1987; Halford *et al.*, 1992; Shewry *et al.*, 1992).

Die HMW-GS besitzen drei konservierte Domänen: eine zentrale repetitive Domäne und jeweils eine N- und eine C-terminale nicht-repetitive Domäne (Abb. 1). Die zentrale repetitive Domäne variiert in ihrer Länge zwischen 481 und 696 Aminosäuren und umfasst damit etwa 74-85% der Gesamtsequenz. Die Sequenz besteht aus sich wiederholenden, zumeist hexa- und nona-Peptidmotiven, die reich an Glutamin, Prolin und Glycin sind. Der Anteil dieser drei Aminosäuren beträgt etwa 70%. Die x-Typ HMW-GS unterscheidet sich gegenüber dem y-Typ hauptsächlich durch das Auftreten eines weiteren tri-Peptidmotivs.

Gegenüber der zentralen, hydrophilen repetitiven Domäne sind die nicht-repetitiven N- und C-terminalen Bereiche kurz und hydrophob. Die N-terminale Region besteht aus 81-89 Aminosäuren in x-Typ Untereinheiten und 104 in y-Typ Untereinheiten. Verbunden mit dieser Deletion ist eine unterschiedliche Anzahl von Cysteinresten, so dass der x-Typ meist drei und der y-Typ fünf Cysteine enthält. Diese ermöglichen die intermolekularen Disulfidbindungen zwischen HMW-GS und LMW-GS. Der C-Terminus besteht in allen Untereinheiten aus 43 Aminosäureresten, einschließlich eines Cysteins (zur Übersicht: Shewry *et al.*, 2002; Gianibelli *et al.*, 2001).



Abbildung 1: Strukturmodell von HMW- und LMW-Gluteninuntereinheiten

Schematische Darstellung der HMW- und LMW-Gluteninuntereinheiten nach Shewry *et al.*, 2002 und Cassidy *et al.*, 1998 (nicht maßstabsgetreu). Die Felder markieren Proteindomänen. Die für die polymere Struktur verantwortlichen Cysteinreste sind als Cys hervorgehoben. Die an intramolekularen Disulfidbindungen beteiligten Cysteinreste der LMW-GS sind durch Linien verbunden. Die repetitive Domäne ist grau markiert.

Die LMW-Glutenine sind Bestandteil des Glutenin-Polymers und stellen etwa 17-24% der Prolamine. Sie beeinflussen, wie die HMW-GS, wenn auch in geringerem Ausmaß, die visco-elastischen Teigeigenschaften durch ihr relatives Vorkommen und die Expression von allelischen Varianten (Payne, 1987; Gupta *et al.*, 1989). Die Gene für die LMW-GS liegen geclustert auf dem kurzen Arm der Chromosomen 1 (1AS, 1BS und 1DS). Diese unterschiedlich großen Loci werden als *Glu-A3*, *Glu-B3* und *Glu-D3* bezeichnet. Der größte Locus *Glu-B3* ist geprägt durch einen großen Polymorphismus. Die Größe der Genfamilie wird auf 30-40 Gene für die Kulturweizen cv. "Cheyenne" und "Chinese Spring" geschätzt (Cassidy *et al.*, 1998; Sabelli und Shewry, 1991).

Aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität in der SDS-PAGE werden die LMW-GS in drei Gruppen (B, C, D) unterteilt. Diese zeigen Unterschiede in ihren Molekulargewichten, der Anzahl von Cysteinresten und der Fähigkeit zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbindungen. Die Aminosäuresequenz der meisten LMW-Glutenine beginnt mit einem Signalpeptid, gefolgt von einer kurzen Domäne mit dem ersten Cysteinrest (Abb. 1). Es folgt ein 70-186 Aminosäure langer repetitiver Abschnitt. Dieser enthält, typisch für die Prolamine, Tandem-Variationen eines kurzen glutamin- und prolinreichen Peptidmotives. Als charakteristisches Motiv für die LMW-GS gilt die Aminosäureabfolge P<sub>1-2</sub>FP/SQ<sub>2-6</sub>. Es folgen ein Abschnitt mit fünf Cysteinresten und eine Sequenz mit einem hohen Glutaminanteil. Der C-Terminus ist einschließlich eines Cysteinrestes innerhalb der LMW-Glutenine stark konserviert.

## **1.1.2 Monomere Prolamine**

Entsprechend ihres Laufverhaltens in der sauren PAGE kann zwischen vier Gruppen von Gliadinen unterschieden werden. Diese werden jedoch aufgrund genetischer Untersuchungen und Analysen der Aminosäuresequenz in die drei Hauptgruppen  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadine zusammengefasst und bilden die Gliadin-Superfamilie (Bietz *et al.*, 1977; Payne *et al.*, 1982; Kasarda *et al.*, 1983). Es handelt sich dabei um hauptsächlich monomere Proteine mit einem hohen Anteil an Prolin und Glutamin.

Die meisten  $\alpha$ -Gliadin-Gene sind auf den *Gli-2*-Loci auf dem kurzen Arm der homologen Chromosomen 6 (*Gli-A2*, *Gli-B2* und *Gli-D2*) lokalisiert. Ein kleiner Teil befindet sich jedoch auf den *Gli-1*-Loci der Chromosomen 6. Der  $\alpha$ -Gliadin-Anteil an den Prolaminen beträgt zwischen 30-37%. Die Anzahl der Genkopien für verschiedene Weizenkultivare und ihre Vorfahren liegen zwischen 25 und 150, von denen wahrscheinlich circa 50% Pseudogene sind (Harbert *et al.*, 1985; Reeves und Okita, 1987; Anderson *et al.*, 1997). Demgegenüber konnten in 2-D-Proteingelelektrophoresen der Weizenkultivare "Chinese Spring" und "Cheyenne" nur 16 bzw. 17 bedeutende  $\alpha$ -Gliadin-Signale nachgewiesen und zugeordnet werden (Lafiandra *et al.*, 1984).

Die Analysen genomischer und cDNA-Sequenzen von  $\alpha$ -Gliadin-Genen haben zur Aufklärung der  $\alpha$ -Gliadin-Primärstruktur wesentlich beigetragen (Abb. 2). Auf ein 20 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid, das cotranslational abgespalten wird, folgt eine kurze, nicht-repetitive Abfolge von Aminosäuren und dann eine bis 100 Aminosäuren lange repetitive Domäne mit typischen Wiederholungen von PQPQPFP- und PQQPY-Aminosäure-Motiven (Shewry und Tatham, 1990; Anderson und Greene, 1997).

Die Aminosäuresequenz der dritten Domäne enthält, neben zwei hypervariablen Polyglutamin-Abschnitten, die für die intramolekularen Disulfidbindungen verantwortlichen Cysteinreste. Die meisten  $\alpha$ -Gliadine enthalten sechs konservierte Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbindungen ausbilden. Es sind jedoch auch  $\alpha$ -Gliadine mit einem zusätzlichen Cystein bekannt. Es wird angenommen, dass bei Vorliegen einer ungeraden Anzahl von Cysteinen die einzelnen Reste für intermolekulare Disulfidbindungen zur Verfügung stehen und diese  $\alpha$ -Gliadine auf diese Weise Teil des Glutenin-Polymers werden können (Lew *et al.*, 1992; Masci *et al.*, 1995).



#### **Abbildung 2: Strukturmodell von α-, γ- und ω-Gliadinen**

Schematische Darstellung der monomeren  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadine nach Gianibelli *et al.*, 2001; Müller und Wieser, 1995, 1997 und Shewry und Halford, 2002 (nicht maßstabsgetreu). Die Felder markieren Proteindomänen. An intramolekularen Disulfidbindungen beteiligte Cysteinreste der Gliadine sind durch Linien verbunden. Die repetitive Domäne ist grau markiert.

Ein  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzvergleich von Anderson und Greene (1997) zeigte, dass ohne Berücksichtigung des hypervariablen Polyglutamin-Abschnittes 70% der Aminosäurepositionen in 26 von 27 Sequenzen konserviert waren. Weitere 21% waren in 22-25 Sequenzen identisch. Dabei konnten die Unterschiede entweder auf einzelne Basenaustausche oder auf fehlende bzw. zusätzliche Codontripletts zurückgeführt werden, so dass keine Verschiebungen im Leseraster entstanden. Diese Veränderungen sind mit Hilfe der für diese Proteine gewöhnlich verwendeten physikalischen und chemischen Untersuchungsmethoden nicht detektierbar. Es wird angenommen, dass die sequenziellen Unterschiede innerhalb der  $\alpha$ -Gliadin-Genfamilie durch Duplikationen und Deletionen aufgrund ungleichen Crossing-overs und Genkonversionen entstanden sind.

Unter den 20 von Anderson und Green (1997) untersuchten genomischen  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen waren acht Pseudogene und zwei partielle genomische Klone mit einem bzw. mehreren Stop-Codons in der Polyglutamin-Domäne. Dies ist möglich durch C $\rightarrow$ T Transitionen der Glutamincodons CAA und CAG zu Stop-Codons (TAA und TAG). Der hohe Anteil an Pseudogenen in der  $\alpha$ -Gliadin-Genfamilie und die konservierte Aminosäuresequenz erklären die Diskrepanz zwischen der Anzahl der Proteine und der angenommen Größe der Genfamilie.

Die  $\gamma$ -Gliadine stellen etwa 20-26% der Prolamine und besitzen Molekulargewichte von 30 bis 40 kDa. Die meisten γ-Gliadin-Gene liegen gemeinsam mit den Genen der ω-Gliadine auf dem Arm der Chromosomen 1 (Gli-A1, Gli-B1 und Gli-D1). Eine kleinere Anzahl liegt zusammen mit  $\alpha$ -Gliadin-Genen auf dem *Gli-2*-Locus. Die Vorhersagen zur Primärstruktur beruhen auch hier im Wesentlichen auf DNA-Sequenzinformationen. An die 20 Aminosäuren des Signalpeptids schließt sich, bevor die repetitive Domäne folgt, eine kurze Abfolge nicht-repetitiver Aminosäuren an (Abb. 2). Es folgt eine Sequenz, die sechs konservierte Cysteinreste und einen auch in den a-Gliadinen und den LMW-Gluteninen existierenden Polyglutamin-Abschnitt enthält. Den C-Terminus bildet eine Sequenz, die wiederum zwei charakteristische Cysteine enthält (Anderson et al., 2001). Insgesamt enthalten die y-Gliadine acht Cysteine, die vier intramolekulare Disulfidbindungen ausbilden. Wie bei den  $\alpha$ -Gliadinen gibt es auch bei den  $\gamma$ -Gliadinen Proteine mit zusätzlichen Cysteinen, mit denen intermolekulare Bindungen zum Glutenin-Polymer gebildet werden können. So konnten sowohl  $\alpha$ - als auch  $\gamma$ -Gliadin-Sequenzen unter den LMW-Polypeptiden des Glutenin-Polymers nachgewiesen werden (Lew et al., 1992; Masci et al., 1995).

Die repetitive Domäne besteht aus Wiederholungen kurzer Peptidmotive. Dabei ist die Abfolge PFPQ<sub>1-2</sub> (PQQ)<sub>1-2</sub> das am häufigsten vorkommende Motiv (Anderson *et al.*, 2001). Die Anzahl der Gene der  $\gamma$ -Gliadin-Familie wird je nach Kultivar auf 15-40 Kopien geschätzt, unter denen sich ebenfalls Pseudogene befinden, jedoch weniger als in der  $\alpha$ -Gliadin-Familie (zur Übersicht: Gianibelli *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2001).

Der Anteil der  $\omega$ -Gliadine an den Prolaminen beträgt 8-15%. Von allen Prolaminen besitzen diese die höchsten Anteile an Glutamin, Prolin und Phenylalanin (70-86%). Jedoch enthalten die  $\omega$ -Gliadine keine Cysteine und überwiegend nur einen einzigen Methioninrest, so dass die  $\omega$ -Gliadine zu der Gruppe der schwefelarmen Prolamine zählen. Die durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte der  $\omega$ -Gliadine liegen je nach Typ zwischen 44 und 75 kDa. Viele der gewonnenen Erkenntnisse über die  $\omega$ -Gliadine beruhen auf Vergleichen mit den schwefelarmen Prolaminen von Gerste und Roggen (zur Übersicht: Hsia und Anderson, 2001; Tatham und Shewry, 1995). Zu Beginn der vorliegenden

Arbeit waren lediglich zwei vollständige genomische ω-Gliadin-Sequenzen veröffentlicht (Hsia und Anderson, 2001). Die ω-Gliadine werden aufgrund ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz in drei verschiedene Typen (ARQ, KEL und SRL) unterteilt. Ihre codierenden Gene können den Gli-1-Loci auf den verschiedenen Chromosomen A, B, und D zugeordnet werden. Die Weizen-SRL-Typ ( $\omega$ 5)-Gene liegen auf dem 1B-Chromosom. Die SRL-Typ-@-Gliadine besitzen einen höheren Anteil Glutamin und Prolin als der ARQund KEL-Typ ( $\omega$ 1,2), die wiederum sehr viel mehr Prolin enthalten (Seilmeier *et al.*, 2001). Die ARQ- und KEL-Typ ω-Gliadine werden den Loci auf den 1A- und 1D-Signalpeptid (19 AS). Es folgt ein nicht-repetitiver Bereich aus zehn bis elf Aminosäuren, darauf folgend eine lange repetitive Sequenz und C-terminal abschließend wieder ein nicht-repetitiven Abschnitt (zehn bis elf AS). Die repetitive Domäne umfasst etwa 90-96% des gesamten Proteins (Abb. 2). Das von Hsia und Anderson (2001) identifizierte Peptidmotiv PFPQ<sub>1-2</sub>PQQ ähnelt dem Motiv, welches für die ω-Secaline (Roggen) und C-Hordeine (Gerste) postuliert wurde (Tatham und Shewry, 1995). Es wird vermutet, dass in der ω-Gliadin-Genfamilie der Anteil der Pseudogene, wie auch in der α-Gliadin-Genfamilie, hoch ist. So enthält eine der beiden vollständigen ω-Gliadin-Sequenzen ein Stop-Codon im Leseraster. Die Frequenz der Glutamincodons CAA und CAG, die durch ein Transitionsereignis zum Stop-Codon werden können, ist damit hoch (Hsia und Anderson, 2001).

# 1.2 Zöliakie

Im Jahr 1950 konnte der niederländische Kinderarzt W. K. Dicke als Erster zeigen, dass von den Weizenkleber-Proteinen (Gluten) im Zusammenhang mit der Zöliakie-Erkrankung eine toxische Wirkung ausgeht. Die Zöliakie, auch Sprue oder glutensensitive Enteropathie genannt, ist eine häufig bereits im Kleinkindalter (zweites Lebenshalbjahr) manifestierte, chronische Verdauungsinsuffizienz. Heute wird angenommen, dass diese infolge einer autoimmunologisch begründeten Unverträglichkeit gegenüber bestimmten Speicherproteinen sowohl aus Weizen (Gliadine) als auch aus Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) auftritt (Böcker *et al.*, 2001; Renz-Polster und Braun, 2001).

Die Zöliakie beschränkt sich auf Menschen europider Abstammung und kommt durch die koloniale Expansion europäischer Völker auf allen Kontinenten vor. Neue epidemiologische Studien belegen eine Inzidenz von bis zu 1%. Die Mehrheit der Fälle bleibt jedoch aufgrund mangelnder oder minimaler Symptome undiagnostiziert. Es wird dann von einer so genannten stillen Zöliakie gesprochen.

Die Intoleranz führt zur Schädigung der Dünndarmschleimhaut und damit zu einem Funktionsverlust, der wiederum eine Malabsorption zur Folge hat. Die Dünndarmschleimhaut ist histologisch charakterisiert durch eine Zottenatrophie und eine Vertiefung der Krypten. Infolge der gestörten Nährstoffaufnahme leiden die Patienten unter Mangelzuständen. Die häufigsten intestinalen Symptome sind Durchfall und Erbrechen. Aufgrund der Malabsorption über einen längeren Zeitraum kommt es zu extraintestinalen Symptomen wie Anämie, Auszehrung, Knochenschmerzen, Mattheit, psychischen Veränderungen sowie Entwicklungsstörungen bei Kindern (zur Übersicht: Schuppan und Esslinger, 2003; Ciclitira, 2001; Böcker *et al.*, 2001; Renz-Polster und Braun, 2001; Feighery, 1999).

Die Pathogenese gilt als multifaktoriell und ist bis heute nicht vollständig verstanden. Die Krankheit wird ausgelöst durch die Aufnahme kleinster Mengen von Gliadinen, Hordeinen und Secalinen mit der Nahrung. Es wurde gezeigt, dass zu den Auslösern alle Gliadine gehören bzw. dass verschiedene Peptide der α-Gliadine toxisch sind. Die Expression von HLA-DQ2 und HLA-DQ8 als wichtige genetische Einflussfaktoren ist belegt. Die Präsentation von Gluten-Peptiden auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) löst in Zöliakie-Patienten die Proliferation von T-Zellen aus. Die T-Zell-Antwort führt einerseits zu einer Interferon vermittelten Entzündungsreaktion und zur Veränderung der Darmmukosa und andererseits zur Produktion von Antikörpern. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt die Gewebe (Tissue)-Transglutaminase (tTGase). Sie wird aus Subepithelzellen des Darms bei mechanischem Stress oder Entzündungsprozessen freigesetzt und durch hohe extrazelluläre Calcium-Konzentrationen aktiviert. Die tTGase katalysiert die Deamidierung und die Vernetzung von Glutaminresten verschiedener Peptide. Die spezifische Deamidierung von Gluten-Peptiden und die Bildung von Aggregaten durch Crosslinking erhöhen die Aufnahme und Präsentation durch APCs und verstärken die Bindung an HLA-DQ2/HLA-DQ8, welche wiederum zur Steigerung der T-Zellantwort führen.

Die Diagnose der Krankheit erfolgt durch eine Biopsie der Dünndarmschleimhaut und durch Antikörpertests (zur Übersicht: Schuppan und Hahn, 2002; Sollid, 1998).

Die bis heute einzige Therapie, unter der sich die Gliadin induzierten Schleimhautveränderungen zurückbilden und die klinischen Symptome rückläufig sind, ist eine lebenslange, strikt glutenfreie Diät. Im Rahmen des BMB+F Leitprojekts "Ernährung - Moderne Verfahren der Lebensmittelerzeugung" ist das Vorhaben "Gentechnische Erzeugung von Weizen ohne Zöliakie-Toxizität" ein Teilprojekt. Das Ziel dieses Projekts ist es, mit Hilfe gentechnischer Methoden die Gliadine des Weizens auszuschalten, um auf diese Weise einen nicht Zöliakie auslösenden Lebensmittelgrundstoff für Zöliakie-Patienten herzustellen.

# 1.3 Gentechnische Ansätze zur Geninaktivierung

Das hexaploide Genom verleiht dem Kulturweizen *Triticum aestivum* L. eine hohe Toleranz gegenüber Mutationen. Die klassische Bestrahlungs- und die chemische Mutagenese führen nur zu Veränderungen einzelner Allele. Durch die homologen Allele der anderen Genome erfolgt in der Regel eine Kompensation, so dass kein dominanter Phänotyp entsteht. Bisher konnten durch Selektion oder klassische Mutagenese keine Gliadin Null-Mutanten erzeugt werden.

Durch den Einsatz neuer gentechnischer Methoden in Verbindung mit *in vitro* Kultur- und Transformationsmethoden ist es möglich, homologe und heterologe Gene in pflanzlichen Zellen und ganzen Organismen zu exprimieren, aber auch endogene Gene in ihrer Expression partiell oder vollständig zu inaktivieren. Die Etablierung von Transformationsmethoden für hexaploiden Weizen (Vasil *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1997) macht seit etwa zehn Jahren diese wichtige Kulturpflanze für neue methodische Ansätze zugänglich, hinter denen angewandte, züchterische und allgemeine, grundlagenorientierte Fragestellungen stehen. Schwerpunkte für Modifikationen in Weizen sind Ansätze zur Identifizierung und Charakterisierung von Enzymen der Stärkebiosynthese und der Speicherproteine. Durch die Veränderung der Expression einzelner Gene sollen Weizenpflanzen mit neuer Zusammensetzung der Stärke und Speicherproteine erzeugt werden (Blechl und Anderson, 1996; Altpeter *et al.*, 1997; Masci *et al.*, 2003).

Gegenüber der Identifikation bisher unbekannter Gene in Genomprojekten bleibt die Aufklärung von Genfunktionen zurück. Vor dem Hintergrund der funktionellen Genomik und anwendungsorientierten Ansätzen zur genetischen Verbesserung von Nutzpflanzen wird noch immer intensiv an neuen, effizienten Techniken zur Geninaktivierung und zum Austausch von Genen gearbeitet.

Die Ansätze zur Insertionsmutagenese durch Transposon- oder T-DNA-Tagging beruhen auf der Zerstörung eines Genes durch die Insertion dieser Elemente in die codierende Sequenz. Aufgrund der bekannten Sequenz der insertierten Elemente ist eine entsprechende Detektion des Insertionsortes möglich. Diese Technik wird erfolgreich für verschiedene Pflanzen, darunter Mais, *Arabidopsis thaliana*, Petunie, Tomate, Flachs, Reis und *Physcomitrella patens* zur Aufklärung von Genfunktionen angewendet (Martienssen, 1998; Maes *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 1999; Hiwatashi *et al.*, 2001). Ein vergleichbar funktionierendes System existiert bislang nicht für Weizen. Bisher gelang der Nachweis über die Aktivierung und Excision von Mais-Ac/Ds-Elementen lediglich in Weizen-Zellkulturen (Takumi, 1997; Takumi *et al.*, 1999).

Eine gezielte Integration zur Inaktivierung eines Gens oder mehrerer bestimmter Gene ist jedoch mit diesen Systemen nicht zu erreichen, da die Integration der Elemente zufällig im Genom erfolgt bzw. die Voraussetzungen bis heute unbekannt sind.

Der routinemäßige Austausch von Genen durch homologe Rekombination gelingt bei den Pflanzen bisher nur bei dem Moos *Physcomitrella patens* (Schaefer und Zryd, 1997; Schaefer, 2001).

In verschiedenen Säugetier-Zellkulturen konnten mit Hilfe von chimären DNA/RNA-Oligonukleotiden einzelne Basen definierter Sequenzen *in vivo* mutiert werden. Die Sequenz der Oligonukleotide ist homolog zur genomischen DNA, mit Ausnahme einzelner Basen, die die Mutation in die Sequenz einführen (Yoon *et al.*, 1996; Coole-Strauss *et al.*, 1996; Rando *et al.*, 2000; Bartlett *et al.*, 2000). Die Einführung von spezifischen Basenveränderungen mit Hilfe dieser Methode konnte in Tabak und Mais gezeigt werden. Die Anwendungen dieser Methode beschränkten sich bisher auf Basenveränderungen, die zu selektierbaren Phänotypen führten, und zeigten eine nur sehr geringe Effizienz (Beetham *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000).

Eine seit Ende der 80er Jahre vielfach in Pflanzen verwendete Methode ist die so genannte Antisense-Technik. Hierfür wird die vollständige Sequenz oder eine Teilsequenz des Zielgens in inverser Orientierung zur endogenen Sequenz in die Pflanzen transformiert und exprimiert. Es wurde angenommen, dass die antisense-RNA durch die Möglichkeit zur Interaktion mit der endogenen Ziel-mRNA zu einem posttranskriptionalen Gene Silencing (PTGS) führt (zur Übersicht: Mol *et al.*, 1994; Bourque, 1995).

Ein anderer Ansatz beruht auf dem "homology-directed gene silencing" (Meyer und Saedler, 1996). Bei dem Versuch, die Blütenfarbe von Petunien durch Einführung zusätzlicher Kopien der endogenen Chalconsynthase zu verstärken, war das Ergebnis überraschend: In vielen Pflanzen variierte die Blütenfarbe bis hin zu vollständig weißen Blüten (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990). Nicht nur die Transgene waren inaktiv, sondern die Einführung der Transgene beeinflusste zusätzlich die Genexpression des endogenen Locus. Das Phänomen Cosuppression kann von stark exprimierten Transgenen ausgelöst werden (Jorgensen *et al.*, 1996; Elmayan und Vaucheret, 1996; Que *et al.*, 1997). Zusätzlich zum PTGS wurde eine transkriptionale Geninaktivierung (TGS) durch Hypermethylierung der entsprechenden DNA-Sequenzen beobachtet.

Ein ähnlicher Gene Silencing Ansatz beruhte auf dem "Virus induced gene silencing" (VIGS), nachdem erkannt worden war, dass PTGS auch durch Viren ausgelöst werden kann (Dougherty *et al.*, 1994; Angell und Baulcombe, 1997; Kumagai *et al.*, 1995).

Die Antisense-Technik und die Ansätze zur Nutzung des Cosuppressions-Phänomens verbindet, dass die Phänotypen der transgenen Pflanzen zwischen Wildtyp, partieller und vollständiger Reduktion der Expression der Zielgene variieren können und in sehr unterschiedlicher Häufigkeit auftreten. Die erzeugten Phänotypen sind häufig nicht stabil, da wiederholt eine Expression der zuvor inhibierten Zielgene unter bestimmten Umweltbedingungen und in nachfolgenden Generationen beobachtet wurde (zur Übersicht: Bourque, 1995; Mol *et al.*, 1994).

# **RNA-Silencing**

Der hinter diesen Ansätzen stehende Mechanismus und die Zusammenhänge zwischen den beobachteten Phänomenen waren lange nicht verstanden und wurden unterschiedlich diskutiert (zur Übersicht: Mol et al., 1994). Zum Verständnis trugen wesentlich die Ergebnisse von Fire und Mitarbeitern (1998) bei. Sie injizierten Caenorhabditis elegans, doppelsträngige RNA (dsRNA), und lösten damit eine sequenzspezifische aus, die verglichen mit der Applikation von sense- oder antisense-RNA mehr als zehnfach stärker war. Noch im selben Jahr konnte in Drosophila (Kennerdell und Carthew, 1998) und Trypanosoma brucei (Ngo et al., 1998) eine Geninaktivierung durch RNA Interference (RNAi) gezeigt werden. In Pflanzen wurde der direkte Nachweis, dass PTGS durch dsRNA ausgelöst wird, von Waterhouse und Mitarbeitern (1998) erbracht. Angenommen wurde, dass die dsRNA die Entstehung eines Nuclease-Komplexes auslöst und dieser dann gezielt die homologe RNA degradiert. Diese Effektor-Nuklease konnte aus Drosophila-Zellextrakten isoliert werden, in denen zuvor RNAi durch die Behandlung mit dsRNA ausgelöst wurde (Hammond et al., 2000). Den ersten Hinweis darauf, wie die Substraterkennung abläuft, ergaben die Untersuchungen von Hamilton und Baulcombe (1999). In transgenen Pflanzen mit PTGS-Phänotyp gelang ihnen der Nachweis von ca. 25 nt antisense-RNA-Molekülen. Sie wiesen diese in Tomatenpflanzen mit Transgen induzierten PTGS der endogenen 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylatoxidase und in Tabakpflanzen mit einem PTGS eines Gens ( $\beta$ -Glucuronidase) ohne Homologie zu einem endogenen Gen nach. Durch die lokale Infektion einzelner Blätter GFP exprimierender Tabakpflanzen mit Agrobakterien, die GFP-Sequenzen in einem binären Ti-Plasmid trugen, konnten sie das Auftreten dieser 25 nt RNAs in Verbindung mit dem ausgelösten systemischen PTGS zeigen. Ihnen gelang auch die Detektion virusspezifischer 25 nt RNA in Pflanzen mit VIGS. Zusammen mit dem Beweis der Existenz von kleinen RNAs in Drosophila (Zamore *et al.*, 2000) und der partiellen Aufreinigung der Effektor-Nuklease, die eine Co-Fraktionierung der kleinen RNAs mit der Nuklease-Aktivität belegte (Hammond *et al.*, 2000), wurde die Verbindung zwischen dem Phänomen Cosuppression in Pflanzen, RNAi bei Tieren und Quelling bei Pilzen immer deutlicher.

Das heutige Verständnis beruht auf biochemischen Untersuchungen in Zellextrakten und genetischen Analysen verschiedener Organismen. Der grundlegende Mechanismus kann in einen Initiations- und einen Effektorschritt unterteilt werden. Im ersten Schritt erfolgt durch eine Nuklease die Prozessierung der dsRNA zu 21-25 nt kleinen, doppelsträngigen RNA-Molekülen, die als small interfering RNA (siRNA) bezeichnet werden. Diese dienen als "guide"-Sequenzen für das Erkennen der mRNA, die nachfolgend degradiert wird. Diese siRNA-Moleküle sind ein wesentliches Merkmal des RNA-Silencing. Die Prozessierung erfolgt durch ein Mitglied der Dicer-Familie dsRNA-spezifischer Endonukleasen, die zuerst in Drosophila identifiziert wurden (Bernstein et al., 2001). Dieses Enzym besitzt eine dsRNA-Bindungsstelle, zwei RNAseIII-Motive, eine Helicase- und eine PAZ-Domäne. Homologe Gene wurden in verschiedenen Organismen gefunden, darunter auch Dicer-like DRL1 (CAF) in Arabidopsis (Park et al., 2002). Im Effektorschritt erfolgt die Inkorporation der siRNA in einen Multi-Proteinkomplex, der als "RNA-induced silencing complex" (RISC) bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass eine ATP-abhängige Aktivierung des RISC für die Trennung und Entwindung der Duplexstruktur der siRNA sorgt und diese einzelsträngigen siRNA-Moleküle die komplementäre RNA identifizieren (Nykänen et al., 2001; Martinez et al., 2002). Die Prozessierung der Ziel-mRNA erfolgt endonukleolytisch in der Mitte der homologen siRNA-Sequenz (Hammond et al., 2000; Martinez et al., 2002; Elbashir et al., 2001). Die geschnittene Ziel-mRNA wird dann vermutlich durch Exonukleasen degradiert (Hammond et al., 2000).

Heute legen übereinstimmende Untersuchungen und Beobachtungen in verschiedenen Organismen die Vermutung nahe, dass dem "homology-dependent gene silencing" ein konservierter Mechanismus zu Grunde liegt.

RNA-Silencing entsteht durch sequenzspezifische Degradation von mRNA, während TGS die Transkription durch Methylierung oder durch Veränderung der Chromatinstruktur auf der DNA-Ebene inhibiert. Beide werden jedoch durch das Auftreten von dsRNA ausgelöst, die wiederum, endonukleolytisch gespalten, als siRNAs in verschiedenen epigenetischen Gene Silencing-Prozessen funktionell sind. Diese dsRNA kann natürlichen Ursprungs sein, beispielsweise durch die Transkription von inverted-repeat Loci. Als exogene Faktoren können Viren und Transgene die Entstehung von dsRNA induzieren. So entsteht bei Replikation der meisten ssRNA Viren durch virale RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) ein doppelsträngiges Intermediat. Für das RNA-Silencing, das bei der Überexpression endogener mRNA beobachtet wurde, wird eine in Pflanzen codierte RdRP postuliert. In Arabidopsis konnte eine solche putative RdRP *SGS2/SDE1* identifiziert werden. Dieser dient aberrant transkribierte ssRNA als Template zur dsRNA-Synthese (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000). DsRNA kann auch ohne Beteiligung von RdRP durch read-through Transkription bei Mehrfach-Integrationen von Transgenen entstehen, wenn diese im Genom als inverted-repeat integriert vorliegen.

Dicer-Proteine in Pflanzen und Tieren generieren noch eine andere Gruppe von kleinen RNA-Molekülen, die als microRNA (miRNA) bezeichnet werden. Sie werden als doppelsträngige, haarnadelförmige Vorstufe aus dem Genom transkribiert. Die ersten eukaryotischen miRNAs, lin-4 und let-7, wurden in *C. elegans* isoliert (Lee *et al.*, 1993). Inzwischen sind aus Arabidopsis nahezu 100 miRNAs identifiziert worden. MiRNAs interferieren mit mRNAs, deren Gene Proteine codieren, die an der Kontrolle entwicklungsspezifischer Prozesse beteiligt sind. Sie gelten als negative Regulatoren, da sie die Proteinbiosynthese inhibieren oder die Degradation der Ziel-mRNA beschleunigen können. Dass pflanzliche miRNAs am RNA-Silencing beteiligt sind und der miRNA-Pathway zumindest teilweise in den RNA-Silencing Prozess integriert ist, belegen verschiedene Untersuchungen (Tang *et al.*, 2003; Llave *et al.*, 2002a, 2002b; Rhodes *et al.*, 2002).

Offenbar sind Dicer-Proteine an verschiedenen Pathways beteiligt. Der eine Weg führt durch die Prozessierung langer, perfekt doppelsträngiger RNA zu dsRNAs, die wiederum durch perfekte Basenpaarung die endonukleolytische Spaltung homologer mRNAs zur Folge haben. Der andere Weg führt über die Prozessierung imperfekter RNA-Duplices zu miRNAs, die dann Teil eines microRNA-Ribonukleoprotein-Komplexes (miRNP) werden. Dieser reguliert dann die Translationsinhibition. In Arabidopsis konnten bisher vier Dicerlike (DCL) Proteine identifiziert werden. Die Untersuchungen von dcl1-Mutanten weisen auf eine regulatorische Funktion von DCL1 in der Pflanzenentwicklung hin. Finnegan *et al.* (2003) konnten in einer Mutante zeigen, dass die miRNA-Produktion blockiert ist, RNA-Silencing und die Produktion von siRNAs jedoch nicht betroffen sind.

In Pflanzen konnten zwei verschiedene Klassen siRNAs identifiziert werden. Die "short siRNAs" mit 21-22 Nukleotiden korrelieren mit der sequenzspezifischen Degradation von mRNA, während die "long siRNAs" mit 24-26 Nukleotiden an der Auslösung des systemischen Gene Silencing beteiligt sind (Hamilton *et al.*, 2002; Mallory *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003).

In Pflanzen konnte die systemische Ausbreitung des RNA-Silencing nach lokaler Virusinfektion und in verschiedenen Pfropf-Experimenten gezeigt werden (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 1998). Die Signale werden systemisch auch über weite Entfernungen durch das Phloem weitergeleitet. Eine Beteiligung von RNA-Molekülen am Signal wird postuliert. Das Signal und der Mechanismus sind bis heute noch nicht aufgeklärt.

Neben einem System zur Weitergabe eines Signals von Zelle zu Zelle erfordert dieses Phänomen die Amplifikation des Signals. Hinweise darauf ergab die Entdeckung des transitiven RNA-Silencing. In *C. elegans* konnten neben den siRNAs mit der entsprechenden Ziel-mRNA-Sequenz auch siRNAs mit Sequenzen nachgewiesen werden, die in 5'-Richtung von der Zielsequenz lagen (Sijen *et al.*, 2001). In Pflanzen dagegen wurde eine Ausbreitung in 5' $\rightarrow$ 3' und in 3' $\rightarrow$ 5' beobachtet. Sind diese Sequenzen komplementär zu anderen mRNAs, richtet sich das Silencing auch auf diese Sequenzen.

Verschiedene Untersuchungen konnten belegen, dass dsRNA auch sequenzspezifische DNA Methylierung (RdDM) auslösen kann. Dieses beobachteten zuerst Wassenegger *et al.* (1994) in transgenem Tabak, der eine cDNA Sequenz eines Viroids enthielt. Nach der Infektion mit dem Viroid konnte eine *de novo* Methylierung der cDNA-Sequenz beobachtet werden. Die RdDM beschränkt sich dabei nicht auf symmetrische Sequenzen (CpG oder CpNpG), sondern erfolgt auch asymmetrisch. Zeigt die dsRNA eine Homologie zu einer Promotorsequenz, entsteht TGS in Verbindung mit der Methylierung.

Neue Untersuchungen, auch in anderen Organismen, weisen auf Verbindungen zwischen RNA-Silencing, Chromatinstruktur und Modifikationen der genomischen DNA hin. Darüber hinaus legen verschiedene Berichte über Heterochromatin-Silencing und Histon3Lysin9-Methylierung eine Beteiligung des RNA-Silencing-Apparates an der Formation von Heterochromatin und an Genomrearrangements nahe. Es wird vermutet, dass dsRNA von centromeren Repeats auf die Formation und die Erhaltung des Heterochromatins zielt. Man nimmt an, dass RNA-Silencing verschiedene Aufgaben im Organismus erfüllt. Es stellt einerseits eine Art Abwehrsystem gegenüber Pathogenen dar, andererseits werden durch die Isolierung repetitiver Sequenzen und mobiler genetischer Elemente Transpositions- und Rekombinationsereignisse verhindert und somit die Stabilität und Integrität des Genoms erhalten. Eine weitere Rolle zeichnet sich in der Regulation endogener Proteincodierender Gene ab (zur Übersicht über verschiedene RNA-induzierte Gene Silencing Aspekte: Cerutti, 2003; Yu und Kumar, 2003; Wang und Waterhouse, 2002; Metzlaff, 2002; Hannon, 2002).

Zu Beginn der Arbeiten 2001 standen weit weniger Informationen über RNA-Silencing in Pflanzen und dessen Anwendungen zur Verfügung als heute (zur Übersicht: Sharp, 1999, 2001; Matzke et al., 2001; Bass, 2001, 2000; Waterhouse et al., 2001). Die ersten Untersuchungen in Pflanzen veröffentlichten Waterhouse et al. (1998). Sie zeigten dsRNA induzierte Geninaktivierung in Tabak durch die gleichzeitige Expression von sense- und antisense-Genfragmenten gegen virale Protease-RNA. Die Frequenz der erreichten Virusresistenz war in den Pflanzen, die gleichzeitig mit dem Sense- und dem Antisense-Konstrukt transformiert wurden, deutlich höher (44-54%) als bei Pflanzen, die entweder nur das Sense- oder nur das Antisense-Konstrukt enthielten (<15%). Das Merkmal Virusresistenz wurde im Gegensatz zu den Sense- oder Antisense-Pflanzen in den co-exprimierenden Linien stabil vererbt. In weiteren Untersuchungen in GUS exprimierendem, transgenem Reis konnten sie ein Silencing durch die Expression einer in-sich-komplementären RNA erreichen. Durch das Transkript mit einer hairpin-loop (hp)-Struktur konnte die endogene GUS-Aktivität um nahezu 90% reduziert werden. Es folgten Untersuchungen zur Silencing-Effizienz mit verschiedenen Konstrukten, deren Produkt eine dsRNA war. Die höchste Effizienz zeigten sowohl in Tabak (96%) als auch in Arabidopsis (100%) loopfreie-hairpin-RNA-Moleküle (ihpRNA). Diese enthielten zwischen den sense- und antisense-orientierten Genfragmenten ein Intron, das durch Spleißen entfernt wurde. HpRNA-Moleküle zeigten eine Silencing-Effizienz von 58-59% (Smith et al., 2000). Das RNA-Silencing endogener Gene zeigten Chuang und Meyerowitz (2000) in Arabidopsis. Als Zielgene wählten sie vier an der Blütenentwicklung beteiligte Gene. Ebenfalls erreichten sie mit hpRNA exprimierenden Konstrukten im Vergleich zu konventionellen sense- bzw. antisense-Konstrukten eine sehr hohe Silencing-Effizienz (88-97%) und konnten eine stabile Vererbung des Phänotyps zeigen. In den transgenen Pflanzen korrelierte die Akkumulation der endogenen mRNA negativ mit der Stärke des Phänotyps. Zu übereinstimmenden Ergebnissen kamen Levin *et al.* (2000) in Untersuchungen zur Geninaktivierung eines essenziellen Gens der Methionin-Biosynthese. Sie verwendeten ein hpRNA-exprimierendes Konstrukt mit einer kurzen Spacer-Sequenz zwischen den senseund antisense-orientierten Gensequenzen, durch die eine hp-loop- Struktur gebildet konnte. Schweizer und Kollegen (2000) zeigten als erste in transienten Untersuchungen eine Geninaktivierung durch dsRNA auf Einzelzellebene in Getreiden. Neben Untersuchungen in Mais und Gerste zeigten sie, dass in Weizen-Epidermiszellen dsRNA mit der Expression von co-transformatierten GUS-Reportergenkonstrukten interferiert.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine stabile und sequenzspezifische, posttranskriptionale Geninaktivierung (PTGS) endogener Gene in Weizen durch RNA Interference erfolgt und ob die Expression einer Genfamilie inhibiert werden kann. Die vorgestellten Untersuchungen sind Teil des Projektes "Gentechnische Erzeugung von Weizen ohne Zöliakie-Toxizität" im Rahmen des BMB+F Vorhabens "Ernährung -Moderne Verfahren der Lebensmittelerzeugung". Die Gliadine, eine Gruppe von Speicherproteinen in der Weizenkaryopse, gehören zu den Auslösern der Krankheitssymptome bei Zöliakie-Patienten. Die Untersuchung erfolgte am Beispiel der  $\alpha$ -Gliadin-Familie, die zusammen mit  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadinen die Gliadin-Superfamilie bildet.

Hierfür sollte durch Sequenzvergleich der veröffentlichten  $\alpha$ -Gliadin-Gensequenzen eine geeignete Zielsequenz identifiziert werden. Drei unterschiedliche RNAi-Konstrukte mit der  $\alpha$ -Gliadin-Zielsequenz sollten auf ihre Eignung für eine stabile und vollständige posttranskriptionale Geninaktivierung der  $\alpha$ -Gliadine in stabil transformierten Weizenpflanzen und deren Nachkommen untersucht werden.

17

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien wurden im Reinheitsgrad "zur Analyse" oder "reinst" bei den folgenden Firmen in Deutschland bezogen: Amersham Biosciences Europe (Freiburg), Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt).

Alle Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

Die verwendeten Enzyme und DNA- und RNA-Längenstandards stammen von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Es wurden Filterpapiere und Sterilfilter der Firma Schleicher&Schuell (Dassel), Nylonmembranen von Amersham Biosciences Europe (Freiburg) und Filmmaterial der Firmen Polaroid (Cambridge, USA), Eastman Kodak (Rochester, USA) und Amersham Biosciences Europe (Freiburg) verwendet.

# 2.2 Pflanzengenotyp und Anzuchtbedingungen

Für die Experimente wurde der Winterweizengenotyp "Florida" (*Triticum aestivum* L.) verwendet. Die Vernalisation der Keimlinge erfolgte acht Wochen unter Langtag-Bedingungen (4°C/2°C (Tag/Nacht), 16 h Licht und 20-25 klx). Die Pflanzen wurden anschließend im Gewächshaus bei 18°C/13°C (Tag/Nacht), 16 h Licht (28 klx, max. 500 klxh/d) angezogen.

# 2.3 Plasmide

Für die Klonierung der Transformationsvektoren wurden die *E. coli*-Stämme DH5α (Hanahan, 1983) und XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook und Russel, 2001).

# pCaIneo (S. Lütticke, Universität Hamburg, unveröffentlicht)

Der Vektor (4,7 kbp) enthält das *E. coli* Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Beck *et al.*, 1982) unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem *Cauliflower Mosaic Virus* und des

Terminators des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*. Der Klonierungsvektor ist pUC18.

# pLNU-GliRNAi (H. Schmidt, DNA Cloning Service, Hamburg)

Der Vektor (5,4 kbp) enthält zwei identische, 313 bp Teilsequenzen eines  $\alpha$ -Gliadin-Gens in sense- und antisense-Orientierung. Die beiden Sequenzen sind durch eine Spacer-Sequenz verbunden. Der Spacer ist eine Teilsequenz (1112 $\rightarrow$ 2109) des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens aus *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986). Das Gen steht unter der Kontrolle des Ubiquitin 1-Promotors aus *Zea mays* (Christensen *et al.*, 1992) und des Terminators der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Der Klonierungsvektor ist pUC18.

# pGliaRNAi-Spacer

Der Vektor (6,5 kbp) enthält die Genkassette des Vektors pLNU-GliRNAi in dem Klonierungsvektor pBluescript (Stratagene Europe, Amsterdam, NL).

# pGliaRNAi-Intron

Der Vektor (7,0 kbp) enthält die 313 bp  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenzen (siehe pLNU-GliRNAi) in sense- und antisense-Orientierung. Dazwischen befindet sich die Sequenz des Introns der Chalconsynthase C2 aus *Zea mays* (Franken *et al.*, 1991). Das Gen steht unter der Kontrolle des Ubiquitin 1-Promotors aus *Zea mays* (Christensen *et al.*, 1992) und des Terminators der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Der Klonierungsvektor ist pBluescript.

# pGliaRNAi-OU

Der Vektor (7,1 kbp) enthält zwei Genkassetten hintereinander. Die 313 bp antisense- $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz (siehe pLNU-GliRNAi) steht unter der Kontrolle des Ubiquitin 1-Promotors aus *Zea mays* (Christensen *et al.*, 1992) und des Terminators der Octopinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die 313 bp sense- $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz steht ebenfalls unter der Kontrolle des Ubiquitin 1-Promotors aus *Zea mays* und wird durch die Terminatorsequenz des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* terminiert. Der Klonierungsvektor ist pBluescript.

# 2.4 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Klonierungen, die PCR- und RT-PCR-Experimente sowie für die Markierung von DNA-Sonden verwendet.

C2 Intron-Primer:

C2 For: 5'-CTG ATT <u>GGA TCC</u> GAA ATT CAA GAG GAT GTG-3' (1031 $\rightarrow$ 1045) C2 Rev: 5'-TCA CAG <u>GAA TTC</u> TCC GGA TCA TCG ACT TGT CGC C-3' (2568 $\leftarrow$ 2568) Die Primer binden im Mais Chalconsynthase-Gen C2 und amplifizieren die 1558 bp Intronsequenz. Diese Primer enthalten eine *BamH*I- bzw. *EcoR*I-Site für die Klonierung.

Int2 For: 5'-ACT AGC AGT GGG AGA ACA GAA-3'  $(1402 \rightarrow 1422)$ 

Int2 Rev: 5'-ATG TCT GTA CGG TAT CGG CC-3' (1830←1849)

Die Primer binden im Mais Chalconsynthase-Gen C2 und amplifizieren einen 447 bp langen Teil der Intronsequenz.

α-Gliadin-Primer:

Gli For: 5'-CCT TTC TCA TCC TTG CCC TCC T-3' (5'-Primer)
Gli Rev: 5'-TAC TGT GGT TGC GGT TGT GGA-3' (3'-Primer)
Die Primer binden in α-Gliadin-Genen aus Weizen cv. "Florida" und amplifizieren die 313 bp α-Gliadin-Teilsequenz, die in den GliaRNAi-Konstrukten enthalten ist.

**GUS-Spacer-Primer:** 

Gus-Sp For: 5'-CCG AAA GAA CTG TAC AGC GAA GA-3' (1410 $\rightarrow$ 1432) Gus-Sp Rev: 5'-CGG TGA TGA TAA TCG GCT GAT GC-3'(1784 $\leftarrow$ 1806) Die Primer binden im *E. coli*  $\beta$ -Glucuronidase-Gen und amplifizieren eine 396 bp Sequenz.

Ubiquitin 1-Promotor-Primer: Ubi For: 5'-ATG CCA GCC TGT TAA ACG CCG-3' (929→949) Ubi Rev: 5'-TGC GCT CCG AAC AAC ACG AGG-3' (1263←1283) Die Primer binden im Mais Ubiquitin 1-Promotor und amplifizieren eine 354 bp Sequenz.

# 2.5 Transformation von Weizen

Die unreifen Weizenembryonen wurden nach Becker *et al.* (1994) biolistisch transformiert. Zusammen mit dem Vektor pGliaRNAi-Spacer bzw. pGliaRNAi-Intron oder pGliaRNAi-OU wurde pCaIneo als Selektionsmarker transformiert. Für die Regeneration und die Selektion wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet (D. Becker, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung). Die Regenerate wurden auf MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) kultiviert und die Selektion erfolgte auf kanamycinhaltigem MS Medium.

# 2.6 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Standardmethoden mit Plasmid-DNA wie Klonierung, Isolierung, Restriktion, Aufreinigung, Fällung und Quantifikation wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Bei der Verwendung von modifizierenden Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Angaben der Hersteller verfahren.

# 2.6.1 Amplifikation der α-Gliadin-Teilsequenz

Die "Florida" α-Gliadin-Teilsequenz wurde in einem 100 µl PCR-Ansatz amplifiziert:

1x PCR-Puffer, 2 U *Taq* DNA-Polymerase, 0,2 mM je dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M je Primer Gli For und Gli Rev, 250 ng genomische DNA aus Weizen cv. "Florida" oder 1,1·10<sup>9</sup> pfu einer 20 dap Weizenkaryopsen cDNA Bank cv. "Florida" (M. Block, Universität Hamburg, unveröffentlicht).

PCR-Programm: 95°C 4', [95°C 1', 58-65°C 1', 72°C 1'] x 28, 72°C 10'

# 2.6.2 Markierung von DNA-Fragmenten

DIG-Markierung mittels PCR

Für Southern Blot-Analysen wurden Digoxigenin-11-dUTP markierte DNA-Sonden durch PCR hergestellt. Ein Reaktionsansatz bestand aus je 0,6  $\mu$ M Primer, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,13 mM dTTP, 0,035 nM DIG-dUTP, 1x PCR-Puffer ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 U *Taq* DNA-Polymerase/100  $\mu$ l Reaktionsansatz und 1 ng Template-DNA/100  $\mu$ l Reaktionsansatz.

Die Temperatur-Zeitprofile der PCR wurden entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer und der Länge des Amplifikates gewählt.

# Radioaktive Markierung

Die radioaktiven Sonden wurden mit einem DecaLabel<sup>™</sup> oder HexaLabel<sup>™</sup> DNA Labeling Kit entsprechend der Herstellerangaben random primed mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markiert. Über MicroSpin<sup>™</sup> S-300 HR Columns wurden die nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Der Einbau von [<sup>32</sup>P]-dCTP wurde mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

# 2.6.3 Isolierung genomischer DNA

Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend zermahlen. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde das Protokoll von Pallotta *et al.* (2000) verwendet. Die RNA wurde durch Aufnahme des Nukleinsäurepellets in 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA und 40 µg/ml Ribonuklease A entfernt.

## 2.6.4 Southern Blot-Analyse

Der Nachweis der Transgene in den Weizenpflanzen erfolgte durch Southern Blot-Analysen der genomischen DNA (Southern, 1975). Es wurden 25  $\mu$ g restringierte DNA in 0,8% Agarose elektrophoretisch getrennt, depuriniert und durch Kapillartransfer mit 20x SSC auf Hybond NX-Nylonmembran geblottet.

Für die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit DIG-dUTP-markierten DNA-Sonden wurde ein Standardpuffer mit Formamid gewählt (DIG Application Manual for Filter Hybridisation, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Hybridisierung und die anschließende chemilumineszente Detektion mit CSPD<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim) erfolgten ent-sprechend dem "DIG Application Manual for Filter Hybridisation". Die Expositionszeiten waren abhängig von der Sensitivität der verwendeten Sonden und der Signalstärke auf den Blots und variierten zwischen 2 h und 16 h.

Für eine Rehybridisierung eines Southern Blots wurde die Sonde durch zweimal 15 min Waschen mit 0,2 M NaOH, 0,1% SDS bei 37°C entfernt.

# 2.6.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Karyopsen wurde nach dem Protokoll von Herrmann, Dissertation Universität Hamburg (2002) durchgeführt. Abweichend von der Vorschrift wurde die Extraktion im Eppendorf-Tube-Maßstab durchgeführt und auf eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion verzichtet. Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde ein Guanidin-HCl-Puffer nach Sambrook und Russel (2001) verwendet.

# 2.6.6 Northern Blot-Analyse

In einem denaturierendem MOPS-Formaldehydgel (Sambrook und Russel, 2001) wurden 15 µg Gesamt-RNA getrennt. Für den Kapillar-Blot der RNA wurde Hybond N+ Nylonmembranen verwendet.

Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde für die Prä- bzw. Hybridisierung verwendet. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (siehe 2.6.2) erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Filter wurden 10-15 min bei 65°C in folgenden Lösungen gewaschen: zweimal 1x SSC, 0,1% SDS und einmal 0,5x SSC, 0,1% SDS.

# 2.6.7 RT-PCR

Aus der Gesamt-RNA wurden durch Inkubation mit Desoxyribonuklease I mögliche Verunreinigungen mit DNA entfernt. Für die reverse Transkription nach Angaben des Herstellers wurden 0,7 µg Gesamt-RNA eingesetzt und mit dem genspezifischen GUS-Sp Rev-Primer (siehe 2.4) inkubiert. Die reversen Transkripte wurden als Template für PCR-Reaktionen mit den GUS-Spacer-Primern verwendet. Die Temperatur-Zeitprofile der anschließenden PCR wurden entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer und der Länge des Amplifikates gewählt.

Alternativ wurde das SuperScript<sup>™</sup> One-Step RT-PCR-System nach Herstellervorschrift verwendet. Für einen Reaktionsansatz wurde jeweils 0,65 µg Desoxyribonuklease I behandelte Gesamt-RNA und die GUS-Spacer-Primer bzw. α-Gliadin-Primer verwendet.

#### 2.7 Proteinanalytik

#### 2.7.1 Proteinextraktion

Die Proteine wurden aus Karyopsen isoliert. Die Extrakte wurden dann für die SDS-PAGE-Experimente bzw. die RP-HPLC-Analysen verwendet.

Die Proteinisolierung folgte im Wesentlichen dem Protokoll von Wieser *et al.*, 1998. Zu der zermahlenen Weizenkaryopse wurde zweimal 0,5 ml Salzlösung (0,4 M NaCl, 67 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) für 10 min zur Isolierung der Albumine/Globuline zugegeben und die Gliadine durch anschließende Zugabe von zweimal 0,5 ml 60% Ethanol für 10 min extrahiert. Für RP-HPLC-Untersuchungen wurden die Glutenine mit zweimal 0,5 ml 0,5% 1-Propanol, 2 M Harnstoff, 1% DTT, 50 mM TrisCl pH 7,5 unter Rühren für 20 min bei 60°C unter Stickstoff herausgelöst. Für SDS-PAGE-Untersuchungen wurden die Glutenine durch zweimal 10 min mit 50% Isopropanol, 80 mM TrisCl pH 8, 1% DTT extrahiert.

Für die RP-HPLC wurden die Extrakte direkt verwendet, während für die SDS-PAGE Untersuchungen die Extrakte in der Regel gegen 5% Essigsäure dialysiert und dann lyophilisiert wurden. Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden die zermahlenen Karyopsen 3 min in einem 1x Standardladepuffer (12,5% Glycerol, 2% SDS, 80 mM TrisCl pH 6,8, 1,5% DTT, Bromphenolblau) aufgekocht und direkt für die SDS-PAGE verwendet.

## 2.7.2 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE-Experimente wurde eine PROTEAN®II xi Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Die Proteine wurden in diskontinuierlichen Laemmli Gelen (Laemmli, 1970) mit verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen getrennt. Die Elektrophorese erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (PROTEAN®II xi cell Instruction Manual, Bio-Rad, München) oder bei 12 mA über Nacht.

#### **Coomassie-Färbung**

Die Proteingele wurden in 5% Trichloressigsäure mit 0,025% Coomassie G250 fixiert und gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit destilliertem Wasser.

#### Silberfärbung

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese 3 h in 50% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert. Die anschließende Reduktion erfolgte für mind. 2 h oder über Nacht in 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutardialdehyd und 0,2% Natriumthiosulfat. Danach wurde das Gel dreimal 30 min in destilliertem Wasser gewaschen und 1 h in 0,1% Silbernitrat und 0,02% Formaldehyd inkubiert. Die Entwicklung erfolgte in 2,5% Natriumcarbonat und 0,2% Formaldehyd. Durch den Zusatz von 0,05 M EDTA, pH 7,4 wurde die Reaktion gestoppt (modifiziert nach Heukeshoven *et al.*, 1988).

## 2.7.3 Reversed-Phased High-Performance Liquid Chromatography

Die Gliadin- und Gluteninextrakte wurden vor der RP-HPLC-Analyse durch eine 0,45  $\mu$ m-Membran filtriert. Das Auftragsvolumen betrug 100-250  $\mu$ l. Die Proben wurden, wie bei Seilmeier *et al.* (2001) beziehungsweise Wieser *et al.* (1998) beschrieben, chromatografiert.

## 3. Ergebnisse

Die Zöliakie ist eine entzündliche Erkrankung des Dünndarms. Zu den Auslösern gehören bestimmte Speicherproteine aus Weizen, Roggen und Gerste. Für Weizen wurde gezeigt, dass die große Proteinfamilie der Gliadine Zöliakie auslösendes Potenzial besitzt. Bis heute ist der Verzicht auf entsprechende Nahrungsmittel die Grundlage jeder Behandlung.

Die vorliegende Arbeit ist Teil des Projekts "Gentechnische Erzeugung von Weizen ohne Zöliakie-Toxizität" und gehört zum BMB+F Vorhaben "Ernährung - Moderne Verfahren der Lebensmittelerzeugung".

Die Etablierung einer geeigneten Methode für eine Inaktivierung aller Gliadin-Gene ist die Voraussetzung für die Herstellung eines gliadinfreien Weizens. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, inwieweit durch RNA Interference in Weizen eine stabile posttranskriptionale Geninaktivierung einer Genfamilie erreichbar ist. Es wurden die Gensequenzen der  $\alpha$ -Gliadine, die zusammen mit den  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadinen die Gliadin-Superfamilie bilden, analysiert und eine  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz als Zielsequenz ausgewählt. Die Teilsequenz wurde isoliert und in drei verschiedene RNAi-Vektoren kloniert. Nach der Transformation in Weizen wurde die Integration, Transkription und Vererbung der Transgene sowohl in den primär transgenen Pflanzen als auch in ihren Nachkommen untersucht. Die Analyse der Zusammensetzung der Speicherproteine von transgenen Weizenkaryopsen erfolgte durch SDS-PAGE und RP-HPLC.

# **3.1** Auswahl der α-Gliadin-Sequenz

Bei den α-Gliadin-Genen handelt es sich um eine große Genfamilie mit sowohl homologen als auch hypervariablen Regionen (siehe 1.1.2). Zur Identifizierung konservierter Regionen und deren Homologiegrad wurde ein DNA-Sequenzvergleich mit der DNAStar MegAlign-Software durchgeführt. In den Sequenzvergleich wurden nur vollständige genomische oder cDNA-Sequenzen aus *Triticum aestivum* L. einbezogen. Die verwendeten Sequenzen stammten, soweit veröffentlicht, aus den Kultivaren "Cheyenne", "Yamhill", "Chinese Spring" und "Mjoelner" (GenBank Acc. No. AJ133602, AJ133603, AJ133604, AJ133605, AJ133606, AJ133607, AJ133608, AJ133609, AJ133610, AJ133611, AJ133612, K02068, K03074, K03075, M10092, M11073, M11074, M11075, M11076, U08287, U50984, U51303, U51304, U51306, U51307, X00627, X01130, X02540 und X17361). Die Abbildung 3 zeigt die Stärke der Homologie von 18 Sequenzen nach einem Clustal Alignment (vollständiger Sequenzvergleich: siehe Anhang, Abb. 20).



#### Abbildung 3: Vergleich von 18 GenBank-α-Gliadin-Sequenzen

Clustal Alignment der GenBank-Sequenzen K02068, K03074, K03075, M10092, M11073, M11074, M11075, M11076, U08287, U50984, U51303, U51304, U51306, U51307, X00627, X01130, X02540 und X17361 mit DNAStar MegAlign-Software. Dargestellt sind die abgeleitete Konsensussequenz und die Stärke der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen. Die rote Markierung steht für eine 100%ige Homologie der betreffenden Base. Orange steht für die gleiche Base bei 15-17 der 18 Sequenzen, Grün bei 12-14 und Blau bei 11-8 Sequenzen. Der Vergleich mit den 18  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen ist im Anhang, Abb. 20 dargestellt.

Weitere elf Sequenzen von Arentz-Hansen et al. (1999) aus dem Kultivar "Mjoelner" wurden berücksichtigt, fehlen jedoch in diesem Vergleich, da den in der GenBank veröffentlichten Sequenzen die Sequenz für das Signalpeptid fehlt. Die Sequenzen entsprechen jedoch ansonsten den für den Vergleich verwendeten  $\alpha$ -Gliadin-Genen. Das Ergebnis des Vergleichs stimmt mit den in der Literatur veröffentlichen Angaben überein, einschließlich der abgeleiteten Homologie der Proteinsequenz (siehe 1.1.2). Dabei steht die rote Markierung für eine 100% ige Homologie. Die Farbe Orange steht für eine übereinstimmende Base bei 15-17 der 18 Sequenzen, Grün bei 12-14 und Blau bei 8-11 Sequenzen. Die analysierten  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen zeigen vier Bereiche mit einer sehr hohen Homologie: Base 1 bis 248, Base 323 bis 416, Base 456 bis 668 und Base 741 bis zum Ende der Konsensussequenz. Dazwischen liegen drei variable Sequenzbereiche. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass diese Bereiche tatsächlich kürzer sind als es die Länge der Konsensussequenz in der Darstellung vermittelt. In diesen variablen Bereichen bestehen jedoch immer Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Sequenzen. Beispielsweise sind in dem ersten variablen Bereich (Konsensussequenzbase 249-322) fünf Typen von Variationen festzustellen, von denen eine unter Berücksichtigung aller 29 Sequenzen mit 55% vorherrscht.

Zur Herstellung von RNAi-Genkonstrukten wurde als Zielsequenz der 5' Bereich der codierenden Region aufgrund der hohen Homologie zwischen den  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen ausgewählt. Bei den zu Beginn der Arbeiten durchgeführten Sequenzvergleichen wies dieser Sequenzteil keine Homologie zu anderen Speicherproteinen auf. Ein kurz vor Fertigstellung der Arbeit durchgeführter BLASTN-Search zeigt Homologien zu LMW-Genen und einer  $\omega$ -Gliadin-Sequenz. Die homologen Sequenzen sind jedoch sehr kurz und umfassen maximal 16 bp für die LMW-Sequenzen und maximal 23 bp für die  $\omega$ -Gliadin-Sequenz. Eine Inaktivierung dieser Gene erscheint unwahrscheinlich, da für die essenziellen siRNAs eine Länge von 21-23 bp angenommen wird. Der ebenfalls konservierte  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzbereich zwischen Base 456 und dem Ende der Konsensussequenz umfasst dagegen einen zu  $\omega$ -Gliadinen homologen Bereich.

Zur Amplifizierung wurden Primer verwendet, die 3' des Start-Codons in der Position  $8\rightarrow21$  und im Bereich von  $346\leftarrow367$  der Konsensussequenz binden. Als Template für PCR-Ansätze wurde eine "Florida" cDNA Bank aus 20 dap-Karyopsen und genomische DNA des Kultivars "Florida" verwendet (siehe 2.6.1). Soweit im Agarosegel abschätzbar, entstanden Produkte mit einer Größe zwischen 300 und 320 bp.



Abbildung 4: Vergleich der "Florida" α-Gliadin-Teilsequenz mit fünf α-Gliadin-Sequenzen

Clustal Alignment des 5' Bereichs der GenBank-Sequenzen M10092, M11074, M11076, U51303, X17361 und der klonierten "Florida"  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz (Glia 313bp rc) mit DNAStar MegAlign-Software. Dargestellt ist die Stärke der Übereinstimmung (Consensus #1) der GenBank-Sequenzen zur klonierten "Florida"  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz. Rot steht für eine übereinstimmende Base der fünf Sequenzen mit der "Florida"  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz, Orange für eine Übereinstimmung mit vier Sequenzen, Grün mit drei, Dunkelblau mit zwei und Hellblau mit nur einer Sequenz.

Die PCR-Produkte aus genomischer DNA und aus der cDNA-Bank wurden kloniert und sequenziert. Von den sieben sequenzierten Klonen waren fünf unique und unterschieden sich untereinander nur in einzelnen Basen, wie es nach den Sequenzvergleichen zu erwarten war. Alle klonierten Sequenzen entsprachen dem am häufigsten vorkommenden Sequenztyp in diesem Bereich. Die Abbildung 4 zeigt einen Vergleich der klonierten "Florida" α-Gliadin-Teilsequenz (Glia 313bp rc) und fünf Sequenzen mit für den 5' Bereich typischen Variationen. Die farbige Markierung über den Sequenzen (M11076, U51303, X17361, M10092 und M11074) mit der klonierten Sequenz. Die Farbe Rot steht für eine übereinstimmende Base der fünf Sequenzen mit der "Florida" α-Gliadin-Teilsequenz, Orange für eine Übereinstimmung mit vier Sequenzen, Grün mit drei, Dunkelblau mit zwei und Hellblau mit nur einer Sequenz. Der in diesem Bereich mit 55% am häufigsten auftretende Sequenztyp (M11074) zeigt eine 99%ige Homologie zur klonierten "Florida" α-Gliadin-Teilsequenz.

# 3.2 Klonierung der Transformationsvektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche RNAi-Konstrukte auf ihre Eignung zur Geninaktivierung der  $\alpha$ -Gliadine untersucht. Das Produkt der klonierten Transformationsvektoren war jeweils eine dsRNA, die als Voraussetzung für das PTGS durch RNAi angesehen wird. Die zur biolistischen Transformation von Skutellumzellen unreifer Weizenembryonen verwendeten Vektoren enthielten die  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz daher in sense- und antisense-Orientierung, so dass die Bildung einer RNA mit einer doppelsträngigen Struktur möglich war.

Vor dem Hintergrund der starken Expression der  $\alpha$ -Gliadine während der Karyopsenentwicklung wurde der in Getreiden konstitutive und starke Mais Ubiquitin 1-Promotor gewählt. Die mit diesem Promotor verbundene konstitutive Expression erleichterte die Analyse der transgenen Pflanzen. Die Transkription des Transgens konnte bis zur Karyopsenentwicklung ohne Hintergrund durch endogene  $\alpha$ -Gliadine untersucht werden.

Die Verwendung des gleichen Promotors und Terminators in den Transformationskonstrukten sollte später die Vergleichbarkeit im Hinblick auf die Effizienz der Konstrukte erleichtern. In der Abbildung 5 sind die drei Transformationskonstrukte schematisch dargestellt.



#### Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transformationsvektoren

*Ubiquitin*-P.: Ubiquitin 1-Promotor aus Mais (*Zea mays* L.); Glia AS: Antisense-orientierte  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz; Spacer: Teilsequenz des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens aus *E. coli*; Glia S: Sense-orientierte  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz; Tnos: Terminatorsequenz des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*; Intron: Intron des Chalcon-synthase-Gens C2 aus Mais; Tocs: Terminatorsequenz der Octopinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Der Vektor pGliaRNAi-Spacer wurde durch die Klonierung der Transformationskassette des Vektors pLNU-GliRNAi in pBS*Sfi* hergestellt. Es wurde angenommen, dass durch die Verwendung der Spacer-Sequenz zwischen den sense- und antisense-orientierten  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen ein Transkript mit einer hairpin-loop-Struktur entsteht.

Für den Vektor pGliaRNAi-Intron wurde das Intron des Chalconsynthase-Gens C2 aus Zea mays (Franken et al., 1991) zwischen die α-Gliadin-Sequenzen kloniert. Das C2-Intron wurde mit den C2-Intron-Primern C2 For und C2 Rev amplifiziert (siehe 2.4). Nach der Sequenzierung der Intron-Exon-Übergänge im PCR-Produkt wurde dieses anstelle der Spacer-Sequenz in die *EcoRI/BamH*I-Schnittstelle des Vektors pGliaRNAi-Spacer eingesetzt.

Das Konstrukt pGliaRNAi-OU ist ein Doppelkassettenvektor. Die sense- und antisense- $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen werden durch zwei unabhängige Ubiquitin 1-Promotoren exprimiert, die aufgrund der Komplementarität der  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen *in planta* eine doppelsträngige Struktur ausbilden können. Zur Klonierung wurde die *EcoRI/BamH*I Spacer-
Sequenz aus pGliaRNAi-Spacer entfernt. Stattdessen wurde der Octopinsynthase-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* zur Terminierung des antisense- $\alpha$ -Gliadin-Transkripts eingefügt, gefolgt vom Ubiquitin 1-Promotor zur Transkriptionskontrolle der sense- $\alpha$ -Gliadin-Sequenz.

# 3.3 Transformation von Weizen

Die Übertragung der  $\alpha$ -Gliadin-RNAi-Vektoren erfolgte nach der von Becker *et al.* (1994) etablierten Methode zur biolistischen Transformation von Skutella unreifer Weizenembryonen.

Mit den Konstrukten pGliaRNAi-Spacer, pGliaRNAi-Intron und pGliaRNAi-OU wurde jeweils pCaIneo als Selektionsmarker co-transformiert (siehe 2.3). Dieser Vektor enthält das *E. coli* Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Kanamycinanaloga vermittelt.

Insgesamt wurden in 65 unabhängigen Transformationsexperimenten 9875 Skutella unreifer Weizenembryonen beschossen.

Nach einer etwa zwölfwöchigen *in vitro* Kulturphase einschließlich einer ersten Selektion mit Kanamycin wurden die Regenerate in Erde gepflanzt. Die Pflanzen wurden erneut durch Besprühen mit einer wässrigen Kanamycinlösung selektiert und resistente Pflanzen molekular analysiert.

Die Tabelle 2 fasst die Transformationsexperimente für die einzelnen Konstrukte zusammen. Das Verhältnis der Anzahl der beschossenen Skutella zur Anzahl der kanamycinresistenten Pflanzen ergibt eine Transformationsfrequenz zwischen 0,4-2,7%. Es wurden 39 der 130 kanamycinresistenten Regenerate, die mit pGliaRNAi transformierten wurden, weiter untersucht. In 26 Pflanzen konnte das RNAi-Transgen nachgewiesen werden. Dies entsprach einer Co-Transformationsfrequenz von 64%. Insgesamt wurden 32 der 39 potenziell transgenen GliaRNAi-Intron Regenerate analysiert, von denen nachweislich 26 das Transgen enthielten. Von den neun kanamycinresistenten Pflanzen, die auf die Integration des GliaRNAi-OU-Konstrukts untersucht wurden, waren vier positiv. Es ergaben sich daher für GliaRNAi-Intron und GliaRNAi-OU Co-Transformationsfrequenzen von 81 bzw. 44%.

Alle regenerierten Pflanzen besaßen in Bezug auf Wachstum, Blüte, Karyopsenansatz und Karyopsenmorphologie einen normalen Phänotyp. Die Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation waren

RNAi- Vektor	Anzahl beschossener Skutella	Anzahl Transformations- experimente	Kan <sup>R</sup> Regenerate	Transformations- frequenz (Kan-Sprühtest)	Analysierte Pflanzen (RNAi-Vektor) (gesamt/positiv)	Co- Transforma- tionsrate
pGliaRNAi- Spacer	4774	27	130	2,7%	39/26	64%
pGliaRNAi- Intron	3048	22	35	1,1%	32/26	81%
pGliaRNAi- OU	2053	16	9	0,4%	9/4	44%

normal fertil, und ihre durch Selbstung erzeugten  $T_1$ - und  $T_2$ -Generationen zeigten ebenfalls den für cv. "Florida" typischen Habitus.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Transformationsexperimente** Kan<sup>R</sup>: Resistenz gegenüber Kanamycin.

# 3.4 Integration der GliaRNAi-Konstrukte in T<sub>0</sub>-Pflanzen

Die Integration der transformierten Gene in das Genom der regenerierten Pflanzen wurde durch Southern Blot-Analysen nachgewiesen. Für die Anzahl der integrierten Genkopien wurde genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease *BamH*I restringiert, die die drei GliaRNAi-Transformationsvektoren linearisiert. Die Vollständigkeit der integrierten Promotor/Gen/Terminator-Kassette wurde durch Ausschneiden der kompletten Kassette mit *Sfi*I überprüft. Nach der Restriktion der genomischen DNA wurde diese in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und durch Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte durch die Hybridisierung mit transgenspezifischen, DIG-markierten DNA-Sonden.

# 3.4.1 Nachweis des GliaRNAi-Spacer-Gens

Für die detaillierte Untersuchung wurden nur genetisch unabhängige Linien ausgewählt. In der Abbildung 6 ist exemplarisch das Ergebnis einer Southern Blot-Analyse von fünf transgenen Pflanzen dargestellt. Die DNA wurde mit *BamH*I (b) zur Bestimmung der Anzahl integrierter Genkopien und mit *Sfi*I (s) auf die Vollständigkeit der Genkassette untersucht. Die Detektion erfolgte durch die Hybridisierung gegen einen 400 bp langen Teil der Spacer-Sequenz mit einer 400 bp DIG-markierten Spacer-Sonde.

In der Abbildung 6 ist die Integration des Transgens in das Genom als hochmolekularer Schmier in den Spuren mit ungeschnittener DNA zu erkennen, wodurch eine Verunreinigung der genomischen DNA mit Plasmid-DNA auszuschließen war (Spuren u). Die Anzahl der integrierten Transgenkopien variiert zwischen einer in der Linie #16 und mindestens elf in Linie #7 (Spuren b). Mit Ausnahme der Linie #63 besitzen alle Linien mindestens eine vollständige Integration der Genkassette (3,6 kbp), wie der Größenvergleich mit der Positivkontrolle zeigt (Spuren s). Das stärkere Signal des detektierten 3,6 kbp Fragmentes in den Linien #5, #7 und #48, verglichen mit #16, deutet auf die Integration mehrerer vollständiger Kopien hin.



#### Abbildung 6: Nachweis des GliaRNAi-Spacer-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen

25μg genomische DNA der Weizenpflanzen #5, #7, #16, #48 und #63 wurden für die Bestimmung der Transgenkopien mit *BamH*I restringiert. Die Vollständigkeit der GliaRNAi-Spacer-Kassette (3,6 kbp) wurde durch Restriktion mit *Sfi*I überprüft. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 400 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus der Spacer-Sequenz amplifiziert wurde. M: Marker; Wt: Wildtyp; u: ungeschnitten; b: *BamH*I-Restriktion; s: *Sfi*I-Restriktion; P: Positivkontrolle (*Sfi*I-Restriktion von pGliaRNAi-Spacer).

## 3.4.2 Nachweis des GliaRNAi-Intron-Gens

Das Ergebnis einer Southern Blot-Analyse von sechs Weizenpflanzen, die mit pGliaRNAi-Intron transformiert wurden, zeigt die Abbildung 7. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 450 bp DIG markierten PCR-Produkt, das mit den C2-Intron Primern Int2 aus der C2-Intron-Sequenz amplifiziert wurde.

Die Anzahl der Integrationen des Transgens in den Pflanzen #113, #114, # 136, #137, #148 und #154 kann durch die Restriktion mit *BamH*I abgeschätzt werden. Die Anzahl der hybridisierenden Fragmente (Spuren b) entspricht der Zahl der Transgenkopien im Genom und liegt beispielsweise für Transgen #154 bei einer Kopie und für #137 bei zwei Kopien. Die vollständige GliaRNAi-Intron-Kassette besitzt eine Größe von 4,1 kbp. Hybridisierungssignale dieser Größe sind nach der Restriktion der DNA mit *Sfi*I in allen untersuchten Linien zu beobachten (Spuren s). Eine deutlich stärkere Signalintensität ist in den Linien #114 und #148 zu beobachten. Dies lässt sich vermutlich auf die unterschiedliche Anzahl vollständig integrierter Transgenkopien zurückführen. So besitzt #114 mindestens sechs Kopien, wie aus der *BamH*I-Restriktion zu schließen ist. In der Linie #148 ist zwar nur ein Signal zu beobachten, jedoch ist dieses Signal vergleichsweise stark, so dass hier wahrscheinlich mehrere Transgenkopien hintereinander an einem Locus integriert sind. Der in den Spuren u sichtbare Schmier in der genomischen DNA belegt die Integration des

Transgens in das Genom. Eine Verunreinigung mit Plasmid-DNA kann ausgeschlossen werden.



Abbildung 7: Nachweis des GliaRNAi-Intron-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen

25 μg genomische DNA der Weizenpflanzen #113, #114, #136, #137, #148 und #154 wurden für die Bestimmung der Transgenkopien mit *BamH*I restringiert. Die Vollständigkeit der GliaRNAi-OU-Kassette (4,1 kbp) wurde durch Restriktion mit *Sfi*I überprüft. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 450 bp DIG-markierten PCR-Fragment, das aus dem C2-Intron amplifiziert wurde. M: Marker; Wt: Wildtyp; u: ungeschnitten; b: *BamH*I-Restriktion; s: *Sfi*I-Restriktion.

# 3.4.3 Nachweis des GliaRNAi-OU-Gens

Für den Southern Blot zur Detektion des pGliaRNAi-OU Konstrukts in genomischer DNA der transgenen Pflanzen wurde eine 360 bp [<sup>32</sup>P]-dCTP markierte Ubiquitin 1-Promotor-Sequenz als Sonde verwendet (Abb. 8). Der Nachweis beschränkte sich auf eine Untersuchung zur vollständigen Integration des Transgens durch Restriktion genomischer DNA mit *Sfi*I. In der Positivkontrolle ist das 4,2 kbp Signal der GliaRNAi-OU-Kassette zu sehen. Die Pflanzen #133, #135, #159 und #170 besitzen alle mindestens eine intakte Integration. Die Linien ohne distinktes Signal gelten als nicht transgen.



## Abbildung 8: Nachweis des GliaRNAi-OU-Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen

25μg genomische DNA der Weizenpflanzen #105, #131, #132, #133, #134, #135, #159, #170 und #192 wurden für die Bestimmung der Vollständigkeit der GliaRNAi-OU-Kassette (4,2 kbp) mit *Sfi*I restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 360 bp [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten PCR-Fragment, das aus dem Ubiquitin 1-Promotor amplifiziert wurde. Wt: Wildtyp; P: Positivkontrolle (*Sfi*I-Restriktion von pGliaRNAi-OU).

# 3.5 Transkription der GliaRNAi-Konstrukte in T<sub>0</sub>-Pflanzen

Die Transkription der GliaRNAi-Konstrukte ist die Voraussetzung für einen Silencing-Phänotyp im Endosperm der Karyopsen transgener Pflanzen. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial transgener Pflanzen isoliert, für die die Integration eines der drei zuvor dargestellten RNAi-Konstrukte in Southern Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis der Transkription erfolgte durch Northern Blot- und/oder RT-PCR-Analyse mit transgenspezifischen Primern.

# 3.5.1 RT-PCR-Analyse von GliaRNAi T<sub>0</sub>-Pflanzen

Nach der Extraktion der Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde diese zur Entfernung verbliebener genomischer DNA mit DeoxyribonukleaseI inkubiert. Für die cDNA-Synthese und die sich daran anschließende PCR wurden für die Untersuchung der transgenen GliaRNAi-Spacer-Pflanzen GUS-Spacer-Primer (siehe 2.4) verwendet. Für die Analyse der transgenen GliaRNAi-Intron- und GliaRNAi-OU-Linien wurden  $\alpha$ -Gliadin-Primer benutzt (siehe 2.4).

Eine RT-PCR-Analyse von neun transgenen GliaRNAi-Spacer Pflanzen wird in der Abbildung 9A gezeigt. Das erwartete Fragment mit einer Größe von 400 bp ist bei den Pflanzen #2, #4, #48, #51, #53, #55 und #59 zu sehen. Die Spezifität des Produkts belegt die Hybridisierung dieser Fragmente mit einer 400 bp DIG-markierten GUS-Spacer-Sonde (Abb. 9B). Die Pflanzen #25 und # 61 zeigen kein Amplifikat. Folglich sind diese Pflanzen nicht transgen, oder das Transgen wird nicht transkribiert.



#### Abbildung 9: Nachweis der Transkription von GliaRNAi-Spacer durch RT-PCR

A: Für die reverse Transkription (siehe 2.6.7) wurden 0,7 μg Gesamt-RNA der Pflanzen #2, #4, #25, #48, #51, #53, #55, #59 und #61 eingesetzt und mit GUS-Spacer-Primern inkubiert. Die cDNA wurde als Template für PCR-Reaktionen mit den GUS-Spacer-Primern verwendet. Die Temperatur-Zeitprofile der anschließenden PCR wurden entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer und der Länge des Amplifikates gewählt. Das spezifische Produkt besitzt eine Größe von 400 bp.

**B**: Hybridisierung der RT-PCR-Produkte mit einer 400 bp DIG-markierten Spacer-Sonde. Das spezifische Produkt hybridisiert bei den Pflanzen #2, #4, #48, #51, #53, #55 und #59.

C: Kontroll-PCR mit Gesamt-RNA als Template.

M: Marker; Wt: Wildtyp; P: Positivkontrolle (PCR von pGliaRNAi-Spacer mit GUS-Spacer-Primern); N: H<sub>2</sub>0-Kontrolle.

Darüber hinaus ist bei allen Pflanzen einschließlich der Wildtyp-Kontrolle ein Amplifikat mit einer Größe von 500 bp sichtbar. Es handelt sich dabei nicht um ein spezifisches Produkt, da keine Hybridisierung mit der GUS-Spacer-Sonde beobachtet werden konnte (Abb. 9B). Eine Sequenzierung des Produkts zeigte, dass dies durch ein unspezifisches Annealing des GUS-Sp Rev-Primers entstand und dass dies keine pGliaRNAi-Spacer-Sequenzen repräsentiert. Die Kontroll-PCR mit Gesamt-RNA (Abb. 9C) zeigt, dass die zur RT-PCR verwendete RNA frei von Kontamination mit genomischer DNA ist.

Die Abbildung 10A zeigt exemplarisch die RT-PCR-Analyse von den transgenen GliaRNAi-Intron-Pflanzen (#112, #113, #114 und #137) und GliaRNAi-OU-Pflanzen (#133 und #135). Das zu erwartende Produkt besitzt eine Größe von 313 bp und ist in den Linien #112, #113, #114, #135 und #137 zu sehen. Die Linie #133 ist, wie Southern Blot-Untersuchungen bestätigten, nicht transgen. In #113 und #135 ist darüber hinaus noch ein kleineres unspezifisches Amplifikat entstanden. Die Spezifität des Amplifikats wurde durch Hybridisierung mit einer 313 bp DIG-markierten  $\alpha$ -Gliadin-Sonde überprüft. Eine Kontamination mit genomischer DNA wurde durch eine Kontroll-PCR mit Gesamt-RNA ausgeschlossen (Abb. 10B).



Abbildung 10: Nachweis der Transkription von GliaRNAi-Intron und GliaRNAi-OU durch RT-PCR A: Für die SuperScript<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR (siehe 2.6.7) wurden 0,7 µg Gesamt-RNA der GliaRNAi-Intron Pflanzen #112, #113, #114 und #137 und GliaRNAi-OU Pflanzen #133 und #135 und  $\alpha$ -Gliadin-Primern verwendet. Das spezifische Produkt besitzt eine Größe von 313 bp.

**B**: Kontroll-PCR mit Gesamt-RNA als Template.

M: Marker; Wt: Wildtyp; P: Positivkontrolle (PCR von pGliaRNAi-Intron mit  $\alpha$ -Gliadin-Primern); N: H<sub>2</sub>0-Kontrolle.

# 3.5.2 Northern Blot-Analyse von GliaRNAi-Spacer T<sub>0</sub>-Pflanzen

Zur Bestimmung der Transkriptgröße des GliaRNAi-Spacer-Gens wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial transgener T<sub>0</sub>-Pflanzen isoliert. Die RNA wurde im Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert. Es wurde hierfür die 400 bp GUS-Spacer-Sequenz oder die 313 bp  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz verwendet. In Abbildung 11A ist das Ergebnis einer Northern Blot-Analyse von GliaRNAi-Spacer- $T_0$ -Pflanzen und einer nicht-transgenen Kontrolle (Wt) zu sehen. Mit Ausnahme der Linien #17 und #18 konnte in allen Pflanzen ein GliaRNAi-Spacer-Transkript mit einer erwarteten Größe von 1,8 kb nachgewiesen werden. Eine Southern Blot-Analyse konnte zeigen, dass die Pflanzen #17 und #18 nicht transgen waren. Die Signale für die Pflanzen #2, #7 und #8 sind sehr schwach, zum Teil bedingt durch unterschiedliche Ladungsmengen Gesamt-RNA (Abb. 11B) oder möglicherweise durch schwächere Transkription des Transgens.



Abbildung 11: Nachweis der Transkription von GliaRNAi-Spacer durch Northern Blot Jeweils 15 µg Gesamt-RNA aus Blattmaterial der GliaRNAi-Spacer T<sub>0</sub>-Pflanzen #1-20 sowie einer nichttransgenen Kontrolle (Wt) wurden in einem 0,8% denaturierenden Agarosegel getrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten  $\alpha$ -Gliadin-Sonde. Das 1,8 kb GliaRNAi-Spacer-Transkript konnte bei den Pflanzen #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #16, #19 und #20 detektiert werden (A). Ladungskontrolle (B).

# 3.6 Vererbung des GliaRNAi-Spacer-Transgens

Die Vererbung des CaIneo- und des GliaRNAi-Spacer-Konstrukts wurde durch Kanamycinbehandlung und Southern Blot-Analyse geselbsteter  $T_0$ - und  $T_1$ -Pflanzen untersucht. Die Pflanzen wurden entweder durch Zugabe von Kanamycin in das Kulturmedium oder später in Erde durch Besprühen mit einer Kanamycinlösung selektiert. Das Endosperm der  $T_1$ -Karyopsen wurde in RP-HPLC- und SDS-PAGE-Experimenten untersucht.

In Southern Blot-Untersuchungen wurden T<sub>1</sub>-Nachkommen der Linien #5, #7, #16, #30, #48, #53 und #63 analysiert. Die Abbildung 12 zeigt das Ergebnis für T<sub>1</sub>-Nachkommen der T<sub>0</sub>-Linien #7 und #16. Die aus Blattmaterial isolierte DNA der T<sub>0</sub>-Pflanzen #7 und #16 sowie von jeweils neun T<sub>1</sub>-Nachkommen wurde mit *BamH*I restringiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer und die Hybridisierung erfolgten wie bei den T<sub>0</sub>-Pflanzen (siehe 3.4.1).

Alle Nachkommen der Linie #7 zeigen das Integrationsmuster der  $T_0$ -Pflanze. Die angezogenen  $T_1$ -Nachkommen der Linie #16 wurden nicht selektiert, so dass es sich bei #16/1 und #16/19 ohne Hybridisierungssignal um nicht-transgene Nachkommen handelt. Auch in dieser Linie zeigen alle transgenen Nachkommen eine gekoppelte Vererbung von Selektionsmarker und dem entsprechenden RNAi-Konstrukt. Die Segregationsverhältnisse entsprachen hierbei einer 3:1 Aufspaltung, wie sie für einen monohybriden Erbgang eines dominanten Allels typisch ist.



Abbildung 12: Vererbung des GliaRNAi-Spacer-Gens in T<sub>1</sub>-Pflanzen der Linien #7 und #16 25 µg genomische DNA der T<sub>1</sub>-Nachkommen und der Parentalpflanzen wurden mit *BamH*I restringiert. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einem 400 bp DIG-markierten PCR-Fragment, amplifiziert aus der Spacer-Sequenz. M: Marker; Wt: Wildtyp.

Zur Gesamtstickstoffbestimmung und für Backversuche mit transgenen Mehlen wurden homozygote T<sub>2</sub>-Pflanzen benötigt. Hierzu wurden 18-30 Karyopsen unterschiedlicher T<sub>1</sub>-Pflanzen ausgesät und die Spaltungsverhältnisse durch Kanamycin-Sprühtest ermittelt. Die Linien #7/14, #11/5, #11/10, #16/7, #30/5 und #30/5 zeigten keine Segregation in der T<sub>2</sub>-Generation und wurden daher als homozygot eingestuft.

Die Transkription des GliaRNAi-Spacer-Konstrukts konnte durch RT-PCR für Nachkommen der Linien #7/14, #11/10 und #30/6 in Gesamt-RNA-Präparationen aus jeweils sechs 20 dap Karyopsen ( $T_2$ ) nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden Proteinextrakte aus T<sub>2</sub>-Karyopsen der als homozygot eingestuften Linien durch SDS-PAGE untersucht. Alle getesteten Karyopsen dieser Linien zeigten entsprechend der T<sub>1</sub>-Karyopsenanalysen (siehe 3.7.2) eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine.

## **3.7** Untersuchungen zur Reduktion der α-Gliadine

Die Untersuchung der Gliadin- und Glutenin-Zusammensetzung erfolgte durch RP-HPLC und SDS-PAGE. Aufgrund der Segregation des Transgens wurden die Karyopsen einzeln untersucht. Die Embryonen wurden von den zu analysierenden Karyopsen abgetrennt und in Sterilkultur angezogen. Nach der Untersuchung der Pflanzen auf die Expression des Selektionsmarkergens wurden resistente T<sub>1</sub>-Pflanzen in Southern Blot-Analysen auf die Integration des Transgens getestet. So konnten die Ergebnisse aus RP-HPLC und SDS-PAGE durch die molekularen Analysen überprüft werden.

# 3.7.1 RP-HPLC-Analysen

In den RP-HPLC-Untersuchungen wurde die Zusammensetzung der Speicherproteine von reifen T<sub>1</sub>-Karyopsen analysiert. Die Karyopse bzw. halbe Karyopse wurde nach Entfernung des zygotischen Embryos gemörsert. Durch aufeinander folgende Extraktionen des Mehls wurde zunächst die Proteinfraktion der Globuline und Albumine isoliert, dann die der Gliadine und abschließend die der Glutenine. Die Gliadin- und Glutenin-Fraktionen wurden danach in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Wieser (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) mit Hilfe der RP-HPLC analysiert.

## **GliaRNAi-Spacer**

Die Abbildung 13A zeigt das charakteristische Gliadin-Profil für *Triticum aestivum* cv. "Florida". Die kürzeste Retentionszeit besitzen die  $\omega$ 1,2-Gliadine, gefolgt von der großen Anzahl der  $\alpha$ -Gliadine. Zuletzt werden die  $\gamma$ -Gliadine von der Säule eluiert. Eine deutliche Veränderung zeigten die Gliadin-Fraktionen der transgenen Linie GliaRNAi-Spacer #11/13. Eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine ist eindeutig durch das Fehlen der charakteristischen  $\alpha$ -Gliadin-Peaks zu erkennen (Abb. 13B). Alle untersuchten transgenen Karyopsen verschiedener Linien zeigten diesen Phänotyp. Die Analyse der Speicherproteine nichttransgener T<sub>1</sub>-Nachkommen ergab keine Unterschiede zum Wildtyp. Es ist daher davon auszugehen, dass die Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine auf den Einfluss der Expression des RNAi-Konstrukts zurückzuführen ist.



Abbildung 13: RP-HPLC-Analyse der Gliadin-Fraktion von Wildtyp (A) und Transgen #11/13 (B) Einzelne Karypsen wurden gemörsert, anschließend die Globuline/Albumine durch Extraktion entfernt und dann die Gliadin-Fraktion isoliert. 100 µl der Gliadin-Fraktion wurden chromatografiert (siehe 2.7.3).  $\alpha$ :  $\alpha$ -Gliadine;  $\gamma$ :  $\gamma$ -Gliadine;  $\omega$ 1,2:  $\omega$ 1,2-Gliadine; \*: enthält Secaline.

Die Frage, inwieweit es sich bei dieser Reduktion bereits um eine vollständige Eliminierung der  $\alpha$ -Gliadine handelt, war mit Hilfe dieser Ergebnisse nicht zu beantworten. Die durch die 1B/1R-Translokation auftretenden Secaline des zur Transformation verwendeten Kultivars "Florida" erschweren die Interpretation der Ergebnisse. Der Vergleich mit der Gliadin-Fraktion eines klassischen Weizens cv. "Rektor" zeigt diese Veränderung (Abb. 14). Zuerst werden die  $\omega$ 5-Gliadine eluiert, gefolgt von den  $\omega$ 1,2-Gliadinen und den  $\alpha$ -Gliadinen. Die längste Retentionszeit besitzen die  $\gamma$ -Gliadine. Deutlich sichtbar ist die Veränderung durch die im cv. "Florida" exprimierten Secaline, deren Retentionszeiten im Bereich der  $\alpha$ - und  $\omega$ 1,2-Gliadine liegen. Die Translokation erklärt auch das Fehlen der  $\omega$ 5-Gliadine in cv. "Florida". Im Bereich der Retentionszeiten der  $\alpha$ -Gliadine werden neben den Secalinen auch die HMW-Gliadine, die auch als Ethanol-lösliche Glutenine bezeichnet werden, und oligomere LMW-Gluteninuntereinheiten eluiert (Shewry *et al.*, 1983). Diese Aggregate können bei der Extraktion nicht von den Gliadinen getrennt werden und sind daher bei der Detektion ein Bestandteil dieser Fraktion.



Abbildung 14: RP-HPLC-Analyse der Gliadin-Fraktion von cv. "Rektor" Eine Karyopse des Weizens cv. "Rektor" wurde gemörsert, anschließend die Globuline/Albumine durch Extraktion entfernt und dann die Gliadin-Fraktion isoliert. 100 µl der Gliadin-Fraktion wurden chromatografiert (siehe 2.7.3).  $\alpha$ :  $\alpha$ -Gliadine;  $\gamma$ :  $\gamma$ -Gliadine;  $\omega$ 1,2:  $\omega$ 1,2-Gliadine;  $\omega$ 5:  $\omega$ 5-Gliadine.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Wieser (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) wurde die Gliadin-Fraktion der transgenen Linie GliaRNAi-Spacer #6/15 in der RP-HPLC getrennt und die Proteine im Elutionsbereich zwischen  $\omega$ - und  $\gamma$ -Gliadinen gesammelt und eine N-terminale Sequenzanalyse durchgeführt. Über die prozentuale Zunahme der freigesetzten Aminosäuren gegenüber dem vorangegangenen Abbauschritt konnte durch Vergleich mit in der Literatur beschriebenen N-terminalen Sequenzen auf die in der Probe enthaltenen Proteine geschlossen werden. Nachgewiesen wurden  $\gamma$ -Gliadine, LMW-GS und  $\omega$ -Secaline sowie Spuren von nicht-Speicherproteinen. Da das  $\alpha$ -gliadintypische Valin an Position drei zwar nachzuweisen war, jedoch Prolin im vierten und Valin im fünften Schritt fehlten, konnte darauf geschlossen werden, dass  $\alpha$ -Gliadine nicht, oder wenn überhaupt, unterhalb der Nachweisgrenze vorkommen. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den detektierten Proteinen nicht um  $\alpha$ -Gliadine handelt.

Bei der Quantifizierung der  $\alpha$ -Gliadine, durch die Berechnung des prozentualen Anteils an der gesamten Peakfläche, müssen die in dieser Fraktion nachweislich enthaltenen anderen Proteine als Hintergrund berücksichtigt werden.

Für den Wildtyp "Florida" lag der prozentuale Anteil der Proteine an der  $\alpha$ -Gliadin enthaltenden Fraktion, bezogen auf die Gliadin-Gesamtfraktion, bei 39-43%. Für die transgene Karyopse #6/15, deren  $\alpha$ -Gliadin enthaltende Fraktion durch Proteinsequenzierung untersucht wurde und in der keine  $\alpha$ -Gliadine nachweisbar waren, ergab sich ein Proteinanteil von 12,3%, bezogen auf die gesamte Gliadin-Fraktion. Der tatsächlich enthaltene  $\alpha$ -Gliadin-Anteil an dieser Fraktion ergab sich dann näherungsweise als Differenz und betrug danach 26-31%.

Es wurden für alle analysierten Karyopsen der GliaRNA-Spacer-Linien #6, #7, #16, #26, #30, #42, #44, #48, #51, #53, #55, #60 und #63 die Anteile der reduzierten  $\alpha$ -Gliadin enthaltenden Fraktion berechnet (siehe Anhang, Tab. 5).

Innerhalb der untersuchten Karyopsen einer Linie lag der minimale prozentuale Anteil bei 12-14% und der maximale bei 25-30%. In den berechneten Werten sind die in diesen Fraktionen nachgewiesenen  $\gamma$ -Gliadine, LMW-GS und  $\omega$ -Secaline enthalten. Bei den Karyopsen mit Anteilen zwischen 12-14% ist es wahrscheinlich, dass die  $\alpha$ -Gliadine vollständig eliminiert sind. Nur weitere Untersuchungen können zeigen, ob in den Karyopsen mit höheren Anteilen noch  $\alpha$ -Gliadine enthalten sind beziehungsweise wie hoch der  $\alpha$ -Gliadin-Gehalt ist oder ob der Anteil der  $\gamma$ -Gliadine, LMW-GS und  $\omega$ -Secaline vergrößert ist.

Die Abbildung 15 zeigt die Analyse der Glutenin-Fraktion des Wildtyps "Florida" (A) und einer transgenen Karyopsen der GliaRNAi-Spacer Linie #11 (B). Zuerst werden die HMW-Glutenine eluiert, gefolgt von den LMW-Gluteninen. In der LMW-Fraktion befinden sich ebenfalls Glutenin gebundene  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadine. Es wird angenommen, dass diese durch eine ungerade Anzahl von Cysteinresten zu Gluteninuntereinheiten Disulfidbindungen ausbilden können (Lew *et al.*, 1992). Die Pfeile im Wildtyp-Chromatogramm markieren die Unterschiede zwischen Wildtyp und dem transgenen Nachkommen der Linie #11. Die Flächen der hervorgehobenen Peaks sind in der transgenen Probe reduziert. Diese Abnahme entstand vermutlich durch die Reduktion der Glutenin gebundenen  $\alpha$ -Gliadine.



Abbildung 15: RP-HPLC-Analyse der Glutenin-Fraktion von Wildtyp (A) und Transgen #11/1 (B) Eine Karyopse des Wildtyps cv. "Florida" und der GliaRNAi-Spacer transgenen Linie #11 wurden gemörsert, Globuline/Albumine und Gliadine durch Extraktion entfernt und dann die Glutenin-Fraktion isoliert und chromatografiert (siehe 2.7.3).

HMW-GS: HMW-Gluteninuntereinheit, LMW-GS: LMW-Gluteninuntereinheit.

## **GliaRNAi-Intron und GliaRNAi-OU**

Für die RP-HPLC-Analysen der mit pGliaRNAi-Intron bzw. pGliaRNAi-OU transformierten Weizenlinien wurden  $T_1$ -Nachkommen aus Selbstungen dieser Linien verwendet. Die primär transgenen  $T_0$ -Pflanzen wurden durch Southern Blot und RT-PCR positiv auf Integration und Expression getestet. Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen pGliaRNAi-Spacer-Linien wurden die zur RP-HPLC-Analyse verwendeten Karyopsen nicht weiter molekular auf die Integration und Expression des GliaRNAi-Intron- bzw. GliaRNAi-OU-Konstrukts untersucht. Mit der RP-HPLC konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp cv. "Florida" festgestellt werden. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Karyopsen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich lediglich um nicht-transgene  $T_1$ -Nachkommen handelte. Unterschiede in den  $\alpha$ -Gliadin-Gehalten konnten dagegen in SDS-PAGE-Untersuchungen in den  $T_1$ -Nachkommen der GliaRNAi-OU exprimierenden Linien festgestellt werden (siehe 3.7.2).

# 3.7.2 SDS-PAGE-Untersuchungen

Bei den SDS-PAGE-Experimenten handelte es sich wie bei den RP-HPLC-Untersuchungen um Ein-Karyopsen- bzw. Halb-Karyopsen-Analysen. Es wurden Gesamtproteinextrakte und durch sequenzielle Extraktion hergestellte Globulin/Albumin-, Gliadin- und Glutenin-Fraktionen analysiert. Nach der elektrophoretischen Trennung in denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgte eine Coomassie-Blue- oder eine Silberfärbung.

# **GliaRNAi-Spacer**

Die Abbildung 16 zeigt ein Coomassie-Blue gefärbtes Polyacrylamidgel, in dem Gesamtproteinextrakte von T<sub>1</sub>-Nachkommen verschiedener transgener GliaRNAi-Spacer Linien analysiert wurden. Als Kontrollen wurden Gesamtproteinextrakte des Wildtyps "Florida" und des Weizens "Rektor" ohne 1B/1R-Translokation und ein "Florida" Gliadin-Extrakt verwendet.



#### Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der Gesamtproteinextrakte von Transgenen

In einem 12,5% denaturierendem Polyacrylamidgel wurden Gesamtproteinextrakte aus GliaRNAi-Spacer T<sub>1</sub>-Karyopsen und Wildtyp "Florida" getrennt und anschließend mit Coomassie-Blue angefärbt. Transgene T<sub>1</sub>-Nachkommen: #5/5, #5/8, #7/1, #11/1, #30/1, #44/5 und #55/5; nicht-transgene T<sub>1</sub>-Nachkommen: #11/3; Wt: Wildtyp; Rk: Weizen cv. "Rektor"; Gl-F: Gliadin-Extrakt aus Wildtyp; M: Marker.

Mit Ausnahme der Gliadin-Fraktion des Wildtyps sind in allen Proben im Größenbereich von 75-120 kDa die HMW-Glutenine gut sichtbar. Es handelt sich bei "Rektor" um die HMW-GS 1Bx7+1By9 und 1Dx5+1Dy10 und bei "Florida" um 1Ax1, 1Bx6+1By8 und 1Dx5+1Dy10. Es folgen in den "Florida"-Proben die  $\omega$ 1,2-Gliadine mit Größen zwischen 50-65 kDa. Die  $\omega$ 5-Gliadine fehlen aufgrund der Translokation. Im Größenbereich zwischen 28-47 kDa befinden sich die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadine sowie die LMW-Glutenine. Für zwei Proteinbanden mit Größen von etwa 36 und 38 kDa ist eine deutliche Veränderung zwischen Wildtyp "Florida" und den Transgenen zu beobachten. Die von der Reduktion betroffenen Proteinbanden sind mit Pfeilen in dem Gliadin-Kontrollextrakt markiert. Ob weitere Veränderungen auftreten, die jedoch aufgrund der Vielzahl der in den Gesamt-extrakten enthaltenen Proteine nicht festgestellt werden konnten, sollten Untersuchungen der Albumin/Globulin-, Gliadin- und Glutenin-Fraktionen zeigen.



#### Abbildung 17: SDS-PAGE-Analyse der Albumin/Globulin-, Gliadin- und Glutenin-Fraktion

In einem 12,5% denaturierendem Polyacrylamidgel wurden Albumin/Globulin-, Gliadin- und Gluteninextrakte aus GliaRNAi-Spacer- $T_1$ -Karyopsen und Wildtyp "Florida" getrennt und anschließend mit Coomassie-Blue angefärbt. Transgene  $T_1$ -Nachkommen: #48/4, #48/27 und #48/28; Wt: Wildtyp; M: Marker.

Die Abbildung 17 zeigt das Ergebnis eines Vergleichs von Wildtyp und drei transgenen T<sub>1</sub>-Nachkommen der Linie #48. In diesem Vergleich der drei Speicherproteinextraktionen wird deutlich, dass eine quantitative Extraktion der verschiedenen Proteine unter den gewählten Extraktionsbedingungen nur zum Teil möglich ist. Die  $\omega$ 1,2-Gliadine (50-65 kDa) befinden sich entgegen den Erwartungen primär in der Albumin/Globulin-Fraktion. In dieser Fraktion werden auch LMW-Glutenine und  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadine (28-47 kDa) detektiert. Ebenfalls sind LMW-Glutenine in der Gliadin-Fraktion enthalten. In der Glutenin-Fraktion können Spuren von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadinen nachgewiesen werden.

In der Albumin/Globulin- und der Glutenin-Fraktion der Transgene konnten keine Veränderungen in der Zusammensetzung beobachtet werden. Die Unterscheidung zwischen transgenem Phänotyp und Wildtyp ist nur in der Gliadin-Fraktion möglich. In dieser Fraktion sind die von der Reduktion betroffenen Proteine gut erkennbar. Das Fehlen der  $\omega$ -Gliadine und die nicht quantitative Extraktion der Gliadine haben auf qualitative Aussagen zur Abnahme der  $\alpha$ -Gliadine keine Auswirkungen.

Die Abbildung 18 zeigt ein Coomassie-Blue (A) und ein Silber (B) gefärbtes Acrylamidgel, in dem die Gliadin-Extrakte von fünf bzw. vier T<sub>1</sub>-Karyopsen der Linien #6 und #30 analysiert wurden. Als Kontrollen wurden RP-HPLC gereinigte  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\omega$ 1,2-Fraktionen verwendet. Diese Fraktionen wurden aus einem "Florida"-Wildtyp-Gliadin-Extrakt isoliert und getrocknet. Die Aufreinigung hat jedoch zur Folge, dass die darin enthaltenen Proteine nicht mehr als distinkte Banden im Polyacrylamidgel laufen. Deutlich zu erkennen ist der Größenbereich der  $\alpha$ -Gliadine von 33-45 kDa mit zwei noch sichtbaren, starken Proteinbanden bei etwa 36 und 38 kDa. Die in der  $\gamma$ -Gliadin-Fraktion enthaltenen Proteine besitzen Größen zwischen 31-40 kDa. In der Fraktion der  $\omega$ -Gliadine befinden sich Proteine mit Molekulargewichten zwischen 45-60 kDa.

Die Unterschiede zwischen den transgenen T<sub>1</sub>-Nachkommen und dem Wildtyp bzw. nichttransgenen T<sub>1</sub>-Nachkommen sind durch Pfeile (1-5) in der Abbildung markiert. Deutlich sichtbar ist das Fehlen von zwei Proteinbanden (Pfeile 2 und 3) im Bereich von etwa 36 und 38 kDa in den Transgenen #6/19, #6/24, #6/12, #6/6, #30/10, #30/19 und #30/26 im Vergleich zum Wildtyp bzw. den nicht-transgenen Karyopsen #6/18 und #30/11. Diese entsprechen in ihrer Größe den noch in der  $\alpha$ -Gliadin-Fraktion erkennbaren, distinkten Proteinbanden. Bei der kleineren der beiden (36 kDa, Pfeil 3) handelt es sich um zwei Banden, wie die Silberfärbung (B) und weitere Untersuchungen in Coomassie-Blue gefärbten Gelen zeigten. Das Fehlen eines weiteren Proteins bzw. einer Proteingruppe bei 40 kDa ist nur in Silber gefärbten Gelen zu beobachten (Pfeil 1). Bei den Veränderungen, die mit den Pfeilen 1-3 markiert sind, ist eine vollständige Reduktion der jeweiligen Proteine wahrscheinlich, da die Proteinbanden in den transgenen Extrakten vollständig fehlen.



Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse der Gliadin-Fraktion von GliaRNAi-Spacer Transgenen In einem 12,5% denaturierendem Polyacrylamidgel wurden Gliadin-Extrakte aus einzelnen Karyopsen der transgenen Linien #6 und #30 getrennt und anschließend mit Coomassie-Blue (A) oder Silber (B) angefärbt. T<sub>1</sub>-Nachkommen: #6/8, #6/19, #6/24, #6/12, #6/6, # 30/10, #30/11, #30/19 und #30/26; Wt: Wildtyp; R: Roggen cv. "Danko";  $\alpha \omega \gamma$ : RP-HPLC Fraktionen isoliert aus Wildtyp; M: Marker.

Deutlich schwächer erscheinen in dem Coomassie-Blue gefärbten Gel (Abb. 18A) bei den transgenen T<sub>1</sub>-Nachkommen zwei Proteinbanden bei ca. 32-33 kDa (Pfeile 4 und 5). Ob es sich bei den verbliebenen Proteinbanden um  $\alpha$ -Gliadine handelt, lässt sich nicht sagen, da die  $\gamma$ -Gliadine ähnliche Molekulargewichte besitzen.

Dass die Veränderungen in der Gliadin-Fraktion auf die Integration und Expression des GliaRNAi-Spacer-Transgens zurückzuführen ist, zeigen die Kontrollextrakte der nichttransgenen  $T_1$ -Nachkommen (#6/18 und #30/11).

Die Analyse eines parallel zu den Weizenproben hergestellten Roggenextraktes cv. "Danko" ergab, dass auch Roggenproteine unter den gewählten Extraktionsbedingungen aus dem Mehl gelöst wurden. Bei den prominenten Banden handelt es sich um die 75kund die 40k-Secaline mit ca. 70 bzw. 34 kDa. Die  $\omega$ -Secaline mit etwa 46 kDa sind weniger stark vertreten. Es ist daher anzunehmen, dass die aufgrund der 1B/1R-Translokation exprimierten Secaline im Weizenkultivar "Florida" nicht im Bereich der durch das Silencing reduzierten  $\alpha$ -Gliadine liegen.

## **GliaRNAi-Intron**

Zur Analyse wurden Nachkommen von transgenen Pflanzen ausgewählt, für die eine partielle Transkription des Transgens durch RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Basierend auf den SDS-PAGE-Ergebnissen der GliaRNAi-Spacer-Nachkommen wurden Gliadin-Extrakte von je acht T<sub>1</sub>-Karyopsen der GliaRNAi-Intron-Linien #113, #114, #136 und #137 untersucht. Ob die getesteten Karyopsen transgen waren, wurde nicht geprüft. Es ist jedoch statistisch unwahrscheinlich, dass es sich in allen Fällen um nicht-transgene Nachkommen handelt. Eindeutige Veränderungen in der Zusammensetzung der Gliadin-Fraktion in T<sub>1</sub>-Nachkommen der GliaRNAi-Intron Linien konnten nicht festgestellt werden. Inwieweit die  $\alpha$ -Gliadine in diesen Linien nur in einem geringen Umfang reduziert waren, konnte mit der gewählten Untersuchungsmethode nicht ermittelt werden. Eine quantitative Extraktion der Gliadine war nicht möglich und Unterschiede bei der Ladung der Proteinmengen der verschiedenen Proben konnten nicht ausgeschlossen werden.

# GliaRNAi-OU

Inwieweit eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine in den Nachkommen der GliaRNAi-OU-Linien erfolgte, sollten Untersuchungen der Gliadin-Fraktion von je acht T<sub>1</sub>-Karyopsen der GliaRNAi-OU-Linien #133, #135, #159 und #170 zeigen. Für diese Linien konnte die Integration des Transgens in Southern Blot- und die Transkription in RT-PCR-Analysen gezeigt werden. Die T<sub>1</sub>-Karyopsen selbst wurden nicht auf das Transgen untersucht.

Die Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Analyse von acht T<sub>1</sub>-Nachkommen der GliaRNAi-OU-Linie #170. Als Kontrollen dienen Gliadin-Fraktionen aus "Florida"

Wildtyp (Wt) und transgenen GliaRNAi-Spacer-Karyopsen (+). Die Proteinbanden der  $\alpha$ -Gliadine, die bei einer Reduktion betroffen und gut sichtbar sind, wurden mit Pfeilen markiert. Eine deutliche Verringerung ist in den Proben #170/6 und #170/8 zu sehen. Eine zumindest teilweise Verminderung zeigen #170/2 und #170/7. Ob die  $\alpha$ -Gliadine in den übrigen Proben nicht oder in geringerem Umfang reduziert sind, lässt sich mit dieser Methode nicht feststellen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Untersuchung von Nachkommen der Linie #159. In den Linien #133 und #135 konnte dagegen keine Abnahme beobachtet werden.



Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der Gliadin-Fraktion von GliaRNAi-OU-Transgenen In einem 12,5% denaturierendem Polyacrylamidgel wurden Gliadin-Extrakte aus acht Karyopsen der transgenen Linie #170 getrennt und anschließend mit Coomassie-Blue angefärbt. T<sub>1</sub>-Nachkommen: 1-8; Wt: Wildtyp; +: GliaRNAi-Spacer Transgene; M: Marker.

# 3.8 Proteinbestimmung

Die RP-HPLC- und SDS-PAGE-Analyse von T<sub>1</sub>-Karyopsen der transgenen GliaRNAi-Spacer-Linien zeigten eine starke Reduktion bzw. vollständige Eliminierung der  $\alpha$ -Gliadine. Um festzustellen, ob die Abnahme der  $\alpha$ -Gliadine zu einer Veränderung des Gesamtproteingehaltes im Vergleich zum Wildtyp führt, wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. D. Mönch (Hamburg) der Gesamtstickstoffgehalt von homozygoten T<sub>2</sub>-Nachkommen der GliaRNAi-Spacer-Linien #7/14, #11/5, #11/6, #30/5 und #30/6 gemessen. Die Stickstoffbestimmung erfolgte mit einem Infrarot-Transmissionsspektrometer (NIT). Als Kontrollprobe wurde Wildtyp "Florida" mit verschiedenen Erntezeitpunkten beziehungsweise aus Feld- und Gewächshausvermehrung gewählt. Die transgenen Pflanzen wurden unter gleichen Gewächshausbedingungen kultiviert und im September 2003 geerntet. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse für die Proben zusammengestellt. Der Gesamtproteingehalt lag bei den Kontrollen bei 11,3-12,8% und bei den transgenen Linien bei 10,5-13,7%. Die Ergebnisse zeigen, dass es trotz der Eliminierung der  $\alpha$ -Gliadine zu keiner signifikanten Veränderung des Gesamtproteingehaltes kommt. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich geplanter Backversuche mit transgenen und nicht-transgenen Mehlen wichtig, da Mehle mit einem annähernd gleichen Gesamtproteingehalt verwendet werden müssen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Probe	Gesamtproteingehalt in %	Wassergehalt in %	
#7/14	10,5	13,1	
#11/5	13,7	12,9	
#11/10	12,4	12,9	
#30/5	11,5	13,2	
#30/6	10,5	13,6	
Kontrolle 1	12,5	12,6	
Kontrolle 2	12,8	12,9	
Kontrolle 3	11,3	13,2	
Kontrolle 4	12,7	12,4	
Kontrolle 5	12,0	12,7	

Tabelle 3: Proteingehalte von  $T_2$ -Saatgut der  $T_0$ -GliaRNAi-Spacer-Linien #7, #11 und #30NIT-Bestimmung des Gesamtprotein- und Wassergehaltes verschiedener transgener Proben bezogen auf dasTrockengewicht. Zur Umrechnung des Stickstoffgehaltes in den Proteingehalt wurde der Faktor 5,7 verwendet.Kontrolle: Wildtyp "Florida".

# **3.9** Effizienz der α-Gliadin-Geninaktivierung

Im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen wurde eine "Florida"  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz isoliert und in drei verschiedene RNAi-Transformationsvektoren kloniert. Es wurde untersucht, inwieweit diese eine Geninaktivierung der  $\alpha$ -Gliadine in hexaploidem Weizen auslösen. Voraussetzung dafür war die Herstellung von transgenen Pflanzen mit jeweils einem der drei Konstrukte und die Charakterisierung dieser Pflanzen mittels Southern- und Northern Blot bzw. RT-PCR. Die Analyse der Weizenspeicherproteine auf eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine erfolgte durch RP-HPLC und SDS-PAGE. In Tabelle 4 werden die Ergebnisse für alle drei Konstrukte zusammengefasst. Es wurden insgesamt 13 GliaRNAi-Spacer-Linien untersucht. Die Anzahl der RNAi-Genkonstrukte variiert in den Linien zwischen einer und elf Kopien. In den Nachkommen aller Linien konnte eine Abnahme der  $\alpha$ -Gliadine durch RP-HPLC und zum Teil auch durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen der Anzahl der Transgenintegrationen und dem Phänotyp konnte nicht festgestellt werden. Die Effizienz der ausgelösten Geninaktivierung wird besonders deutlich vor dem Hintergrund, dass es sich bei den  $\alpha$ -Gliadinen um eine Genfamilie mit vielen exprimierten Mitgliedern handelt.

GliaRNAi- Vektor	Linie	Transgenkopien (Anzahl/	Transkription (Northern Blot	Reduktion der α-Gliadine (T <sub>1</sub> -Karyopsen)	
		vollständig)	bzw. RT-PCR)	<b>RP-HPLC</b>	SDS-PAGE
	5	4 / ≥1	+	+/(24)	+
	7	11/≥1	+	+/(8)	+
	16	1/1	+	+/(7)	n.a.
	26	≥8 / >1	+	+/(2)	n.a.
	30	3 /≥1	+	+/(15)	+
	42	4 / ≥1	+	+/(1)	n.a.
pGliaRNAi- Spacer	44	2/2	+	+/(3)	+
I	48	8-10 / ≥1	+	+/(3)	+
	51	2-3 /≥1	+	+/(3)	n.a.
	53	3 / -	+	+/(4)	+
	55	9 / ≥1	+	+/(3)	+
	60	4 / ≥1	+	+/(1)	n.a.
	63	6 / -	+	+/(8)	n.a.
	112	1 / -	+	-/(2)	n.a.
	113	4 / ≥1	+	-/(1)	-/(8)
	114	6 / ≥1	-	-/(2)	-/(8)
pGliaRNAi-	136	1-2 / ≥1	+	-/(2)	-/(8)
Intron	137	2 / ≥1	+	-/(2)	-/(8)
	154	2 / ≥1	+	-/(2)	n.a.
	158	2 / ≥1	+	-/(1)	n.a.
	160	2-4 / n.a.	+	-/(2)	n.a.
	133	n.a. /≥1	+	-/(2)	-/(8)
	134	n.a. / ≥1	+	-/(2)	n.a.
pGliaRNAi- OU	135	n.a. / ≥1	+	-/(2)	-/(8)
	159	n.a. / ≥1	+	n.a.	+/(8)
	170	n.a. / ≥1	+	n.a.	+/(8)

#### Tabelle 4: Zusammenfassung der Analysen der GliaRNAi-transgenen Linien

Analyseergebnisse für GliaRNAi-Spacer-, GliaRNAi-Intron- und GliaRNAi-OU-Linien aus Southern Blot, Northern Blot, RT-PCR, RP-HPLC und SDS-PAGE. +: Reduktion; –: keine Reduktion (Wt-Phänotyp); n.a.: nicht analysiert.

In allen untersuchten Nachkommen der acht GliaRNAi-Intron-Linien konnte weder in der RP-HPLC noch in der SDS-PAGE eine Verringerung der  $\alpha$ -Gliadine detektiert werden. Eine abschließende Aussage über die Effizienz ist nicht möglich, da einerseits die untersuchten Nachkommen selbst nicht auf die Integration des Transgens getestet wurden und andererseits eine zu geringe Anzahl Proben analysiert wurde. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist die Funktionalität dieses Konstrukts fraglich.

Die Untersuchung der Nachkommen der GliaRNAi-OU-Linien legte eine geringe Effizienz für dieses Konstrukt nahe. Da eine Reduktion in einigen Nachkommen der Linien #159 und #170 nachgewiesen werden konnte, wurde der Beweis erbracht, dass durch die gleichzeitige Expression der sense- und antisense-orientierten  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz eine Geninaktivierung ausgelöst wird. Das Konstrukt ist funktional, jedoch tritt der Phänotyp nur mit einer geringen Frequenz auf. Für eine endgültige Beurteilung sind weitere Analysen notwendig, da die getesteten Nachkommen wie die der GliaRNAi-Intron-Linien nicht molekular charakterisiert wurden beziehungsweise die Anzahl der untersuchten Proben und Linien gering ist.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit in hexaploidem Weizen (*Triticum aestivum* L.) durch RNA Interference (RNAi) eine posttranskriptionale Geninaktivierung (PTGS) einer Genfamilie möglich ist. Als Teil des Projektes "Gentechnische Erzeugung von Weizen ohne Zöliakie-Toxizität" im Rahmen des BMB+F Leitprojektes "Ernährung - Moderne Verfahren der Lebensmittelerzeugung" wurde dieser gentechnische Ansatz zunächst auf sein Potenzial zur Erzeugung eines  $\alpha$ -gliadinfreien Weizens untersucht. Die  $\alpha$ -Gliadine sind Speicherproteine im Weizenendosperm und gelten zusammen mit den  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadinen als Auslöser der Zöliakie, einer chronischen Verdauungsinsuffizienz. Sollte der methodische Ansatz erfolgreich sein, so ist die vollständige Eliminierung der Gliadine in weitergehenden Arbeiten geplant.

Zur Eliminierung der  $\alpha$ -Gliadine durch RNAi wurden die in Datenbanken veröffentlichten  $\alpha$ -Gliadin-Gensequenzen analysiert und innerhalb der  $\alpha$ -Gliadin-Genfamilie ein konservierter Sequenzteil als Zielsequenz ausgewählt. Drei unterschiedliche Konstrukte mit dieser  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz (pGliaRNAi-Spacer, pGliaRNAi-Intron und pGliaRNAi-OU) wurden kloniert und in Weizen transformiert. Die stabile Integration und Vererbung der Transgene wurde durch molekulare Analysen gezeigt. In Weizenkaryopsen aller untersuchten GliaRNAi-Spacer exprimierenden Pflanzen konnte in RP-HPLC- und SDS-PAGE-Untersuchungen eine deutliche Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine nachgewiesen werden. Exemplarisch wurde durch Proteinsequenzierung einer Linie gezeigt, dass die  $\alpha$ -Gliadine vollständig eliminiert werden konnten. Hierdurch wurde das Ziel der Arbeit erreicht, einen  $\alpha$ -gliadinfreien Weizen mittels RNAi zu erzeugen. Erstmals ist es darüber hinaus gelungen, eine Genfamilie mit etwa 40-75 aktiv transkribierten Genen auszuschalten.

## 4.1 Transformation von Weizen

Die Herstellung der transgenen Weizenpflanzen erfolgte mit geringfügigen Veränderungen nach dem etablierten Protokoll von Becker *et al.* (1994) für die biolistische Transformation von Weizen. Insgesamt wurden 174 kanamycinresistente Pflanzen selektiert. Bezogen auf die Anzahl der transformierten Skutella ergab sich daraus eine Transformationsfrequenz von 1,8%. Diese Rate ist vergleichbar mit den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Werten von 0,5-2,5% (Vasil *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Nehra *et al.*, 1994). Die Transformationsfrequenz für die GliaRNAi-Gene ist vermutlich etwas geringer. Da nicht alle kanamycinresistenten und potenziell transgenen GliaRNAi-Spacer- und GliaRNAi-Intron-Pflanzen analysiert wurden, ist es möglich, dass sich darunter, wie auch unter den analysierten Pflanzen, weitere nicht-transgene und klonale Pflanzen befinden.

Die Integration der übertragenen GliaRNAi-Kassetten wurde in molekularen Analysen nachgewiesen. Durch Restriktionsanalysen wurde die Anzahl der integrierten Genkopien bestimmt und die Vollständigkeit des Gens überprüft. Anhand der Transgen-Integrationsmuster der dreizehn detailliert untersuchten GliaRNAi-Spacer, acht GliaRNAi-Intron und fünf GliaRNAi-OU transgenen Weizenpflanzen konnte festgestellt werden, dass diese aus unterschiedlichen, unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangen waren. Die Anzahl der Transgenintegration variierte zwischen einer Kopie in Linie #16 und komplexen Loci mit bis zu elf Kopien in Linie #7. Ebenfalls wurden konkatamere Integrationen beobachtet. Mit Ausnahme der Pflanzen #53, #63 und #112 konnte in allen T<sub>0</sub>-Pflanzen die Integration mindestens einer vollständigen Transgenkopie nachgewiesen werden. Der direkte DNA-Transfer durch Partikelbeschuss führt häufig zu großen Loci mit multiplen Transgenintegrationen. Es entstehen Locusstrukturen mit einer einzelnen intakten Kopie bis hin zu komplexen Anordnungen mehrerer intakter, aber auch fragmentierter Gene. Dies belegen verschiedene Untersuchungen transgener Loci durch Sequenzierungen, Southern Blot-Analysen und Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (zur Übersicht: Kohli et al., 2003).

Die Untersuchungen zur Vererbung des GliaRNAi-Spacer-Konstrukts an die T<sub>1</sub>-Generation zeigten, dass die Transgene gemeinsam auf die Nachkommen übertragen wurden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Integration in einen Locus erfolgte und dieser gemeinsam vererbt wurde. Die Segregation der Transgenkopien in der T<sub>1</sub>-Nachkommenschaft der Linie #63 deutete auf die Integration in mehr als einen Locus hin. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse entsprechen den vorangegangenen Analysen transgener Weizenpflanzen anderer Arbeitsgruppen. Eine klassische Vererbung und Expression der Transgene in den Nachkommen konnte auch hier beobachtet werden (Vasil *et al.*, 1993; Weeks *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Nehra *et al.*, 1994).

# 4.2 Konstruktdesign und Effizienz der α-Gliadin-Geninaktivierung

Für ein System zur Inhibierung von Genfunktionen ist es wichtig, dass eine vollständige Inhibition der Genexpression erfolgt und dass der erzielte Phänotyp stabil an die Nachkommenschaft vererbt wird. Ebenfalls von großem Interesse ist die Frequenz, mit der Gene Silencing-Phänotypen erzeugt werden können. Dies gilt besonders für den Einsatz einer entsprechenden Methode in Pflanzen, die bis heute nur mit verhältnismäßig geringer Effizienz transformierbar sind, zu denen nach wie vor auch der hexaploide Weizen zählt. Ist die Frequenz gering, müssen für eine Geninaktivierung viele unabhängige transgene Pflanzen erzeugt werden, um den gewünschten Phänotyp zu selektieren. Für Weizen dauert die Herstellung transgener Pflanzen etwa zehn bis elf Monate, beginnend mit der Isolierung unreifer Embryonen als Ausgangsmaterial für Transformationen bis zur Reife der transgenen Pflanzen. Eine Methode mit geringer Frequenz ist arbeits- und zeitaufwendig und somit auch sehr kostenintensiv.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine sehr effiziente und stabile posttranskriptionale Geninaktivierung in hexaploidem Weizen am Beispiel der  $\alpha$ -Gliadine, einer Gruppe von Speicherproteinen, gezeigt werden.

Für die Herstellung von Pflanzen mit einem stabilen und vererbbaren Gene Silencing Phänotyp durch RNAi werden für die Transformation Vektoren verwendet, deren Produkt eine RNA ist, die eine doppelsträngige Struktur ausbilden kann. Einen wichtigen Einfluss auf die Effizienz des Konstrukts hat dabei die Struktur der exprimierten RNA und damit verbunden das Design des Vektors.

Im Rahmen der Untersuchung, inwieweit durch RNAi in hexaploidem Weizen ein posttranskriptionales Gene Silencing einer Genfamilie möglich ist, wurden drei verschiedene Vektoren kloniert. Jeder der drei Vektoren exprimiert die gleiche  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz in sense- und antisense-Orientierung. Das Design orientierte sich an bereits zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Veröffentlichungen zu RNAi in Pflanzen (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Chuang und Meyerowitz, 2000; Levin *et al.*, 2000). Zur Expression der  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz in sense- und antisense-Orientierung wurde der konstitutive Mais Ubiquitin1-Promotor verwendet. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass der Ubiquitin 1-Promotor während der gesamten Karyopsenentwicklung bis zur Reife aktiv ist (S. Lütticke und D. Becker, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung).

Das klonierte Transformationskonstrukt pGliaRNAi-OU ist ein Doppelkassettenvektor. Zwei unabhängige Ubiquitin 1-Promotoren exprimieren die sense- beziehungsweise antisense-orientierte  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz. Aufgrund der Komplementarität kann *in planta* eine doppelsträngige RNA-Struktur ausgebildet werden. Das Produkt der Vektoren pGliaRNAi-Spacer und pGliaRNAi-Intron ist dagegen ein Transkript, das bedingt durch die enthaltenen sense- beziehungsweise antisense-orientierten  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenzen eine doppelsträngige Struktur ausbilden kann. Die  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenzen wurden im Vektor pGliaRNAi-Spacer durch eine 1000 bp Sequenz aus dem *E. coli*  $\beta$ -Glucuronidase-Gen verbunden, so dass die Bildung einer hairpin-loop (hp) Struktur möglich ist. Statt der GUS-Spacer-Sequenz enthält der Vektor pGliaRNAi-Intron die 1560 bp Intronsequenz der *Zea mays* Chalconsynthase C2. Durch die Prozessierung des Transkripts sollte das Intron herausgespleißt werden und zur Ausbildung einer sense-antisense hairpin-Struktur führen. Dabei ist unbekannt, ob die Bildung der dsRNA-Struktur bereits vor oder erst nach dem Spleißen erfolgt.

Während in Pflanzen mit dem Intron-hairpin-RNA (ihp) exprimierenden Konstrukt (pGliaRNAi-Intron) keine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine beobachtet werden konnte, zeigten zwei von fünf Linien mit dem Doppelkassettenvektor pGliaRNAi-OU eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine. Eine Frequenz für das Auftreten eines Phänotypes von 100% konnte bei transgenen Pflanzen beobachtet werden, die mit dem hpRNA exprimierenden Konstrukt (pGliaRNAi-Spacer) transformiert worden waren. In allen dreizehn untersuchten Linien konnte eine Verringerung der  $\alpha$ -Gliadine beobachtet werden.

Eine Reihe von verschiedenen Untersuchungen belegen übereinstimmend die hohe Effizienz für das Auftreten von PTGS für Transformationskonstrukte, die eine in-sich-komplementäre hairpin RNA codieren. Dies zeigten durch den direkten Vergleich von hpRNA exprimierenden Vektoren mit Cosuppressions- und Antisense-Konstrukten Waterhouse et al. (1998), Chuang und Meyerowitz (2000), Smith et al. (2000), Levin et al. (2000), Schweizer et al. (2000), Wesley et al. (2001), Stoutjesdijk et al. (2002), Liu et al. (2002), Zentella et al. (2002) und Wang und Wagner (2003). Die Gene Silencing-Konstrukte wurden entweder stabil in Arabidopsis, Tabak, Reis und Baumwolle transformiert oder transient in Gerste, Mais und Weizen exprimiert und richteten sich gegen virale Gene, Transgene oder endogene Gene. Die veröffentlichten Frequenzen liegen für hpRNA exprimierende Konstrukte zwischen 44-95% und für ihpRNA exprimierende Konstrukte zwischen 45-100%, während die Angaben für sense- und antisense-RNA-Konstrukte bei 0-53% liegen. Auch wenn die Werte im Vergleich stark variieren, waren jedoch stets die hp- bzw. ihp-RNA exprimierenden Konstrukte deutlich effizienter. Unterschiedliche Ergebnisse bei der Verwendung von Doppelkassettenvektoren ergaben Untersuchungen von Waterhouse et al. (1998) und Chuang und Meyerowitz (2000). Waterhouse et al. (1998) erreichten in Tabak durch die gleichzeitige Expression von sense- und antisenseorientierten Genfragmenten gegen virale Protease RNA in 44-54% der transgenen Linien eine Virusresistenz. Gegenüber den Doppelkassettenvektoren konnte in weniger als 15% der Pflanzen mit Cosuppressions- oder Antisense-Konstrukten eine Resistenz beobachtet werden. Dagegen lag die Frequenz für das PTGS dreier endogener Gene in Arabidopsis für den verwendeten Doppelkassettenvektor im selben Bereich wie für die Cosuppressions- und Antisense-Konstrukte (Chuang und Meyerowitz, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielte Silencing-Effizienz für den Doppelkassettenvektor und für das hpRNA exprimierende Konstrukt stimmen mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen überein und belegen die Eignung von hpRNA exprimierenden Konstrukten für eine erheblich effizientere Geninaktivierung in Weizen gegenüber konventionellen Cosuppressions- und Antisense-Ansätzen. Dass kein Silencing-Phänotyp für das verwendete ihpRNA exprimierende Konstrukt beobachtet werden konnte, steht den Ergebnissen von Smith et al. (2000), Wesley et al. (2001), Stoutjesdijk et al. (2002), Wang und Wagner (2003) und Teerawanichpan et al. (2003) entgegen. In diesen Untersuchungen konnte mit ihp-Konstrukten ein sehr effizientes PTGS ausgelöst werden. Die Frequenz für das Auftreten des PTGS-Phänotyps war für die ihp-Konstrukte höher als für hp-Konstrukte. Die in der Literatur beschriebenen Phänotypen waren jedoch für die hpRNA- und ihpRNA exprimierenden Konstrukte identisch (Stoutjesdijk et al., 2002; Wang und Wagner, 2003). Die möglichen Gründe für die höhere Frequenz, mit der ihp-Konstrukte PTGS auslösen, werden kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass das Spleißen des Introns das Alignment der komplementären Sequenzen und damit die Ausbildung der Duplex-Struktur fördert oder die Prozessierung den Export der dsRNA aus dem Nukleus erleichtert. Spekuliert wird ebenfalls darüber, ob der durch eine Spacer-Sequenz entstehende Loop nukleasesensitiver ist (Smith et al., 2000; Wesley et al., 2001).

Als Erklärung dafür, dass in den ihpRNA exprimierenden GliaRNAi-Intron-Pflanzen keine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine beobachtet werden konnte, sind verschiedene Ursachen denkbar. Für die Untersuchungen hinsichtlich einer Verringerung der  $\alpha$ -Gliadine wurde das Endosperm der T<sub>1</sub>-Generation verwendet. Die Proben wurden jedoch nicht auf die Existenz des Transgens untersucht. Da das Transgen segregiert, ist es möglich, dass lediglich nicht transgene Nachkommen analysiert wurden. Eine unterhalb der Nachweisgrenze liegende Verminderung erscheint als Ursache unwahrscheinlich, da die in der Literatur beobachteten Phänotypen für die hpRNA- und ihpRNA exprimierenden Konstrukte identisch sind. Es ist ebenfalls möglich, dass das aus Mais stammende Intron der Chalconsynthase C2 nicht oder nicht effizient in Weizen gespleißt wird. Im Rahmen der Arbeit wurde nicht untersucht, ob eine Prozessierung erfolgt. Gegebenenfalls ist eine Abstimmung von Intron und Zielsequenz erforderlich. So enthalten die Gene der Prolamine in Weizen keine Introns und eine Erkennung bzw. Unterscheidung von Intron bzw. Exon kann daher per se problematisch sein. Sollte das Intron nicht gespleißt werden, ist es denkbar, dass eine Sekundärstruktur der RNA entsteht, die der Struktur der GliaRNAi-Spacer-Transkripte gleicht. Warum jedoch kein Silencing-Phänotyp wie bei den GliaRNAi-Spacer-Pflanzen auftrat, ist bisher nicht geklärt. Anhaltspunkte auf die Größe und Struktur des Transkripts können weitere Analysen der erzeugten Pflanzen liefern.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, inwieweit eine vollständige oder eine nur partielle Geninaktivierung erreicht wird. In den Karyopsen transgener Nachkommen der GliaRNAi-Spacer exprimierenden Linien konnte eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine nachgewiesen werden. In den SDS-PAGE-Untersuchungen war die Zusammensetzung der untersuchten Proteinextrakte transgener Karyopsen einheitlich. Im Vergleich zum Wildtyp fehlten in den Transgenen zwei etwa 38 und 40 kDa große Proteinbanden vollständig. Drei weitere Proteinbanden erschienen verringert. Da sich die  $\alpha$ -Gliadine im Polyacrylamid-Gel im selben Größenbereich befinden wie die  $\gamma$ -Gliadine und LMW-Glutenine, ist keine Aussage möglich, inwieweit es sich um eine vollständige Eliminierung oder lediglich um eine Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine handelt. Das fehlende Auftreten von zwei Proteinbanden mit circa 38 und 40 kDa und die Verringerung einer im Wildtyp sehr dominanten Proteinbande bei 36 kDa legen allerdings zumindest eine starke Verminderung nahe.

In den RP-HPLC-Chromatogrammen ist ebenfalls in allen Transgenen eine deutliche Reduktion der Proteinmenge in der  $\alpha$ -Gliadin enthaltenden Fraktion sichtbar. Die Mengen der Proteine in dieser Fraktion sind jedoch zwischen einzelnen transgenen Karyopsen einer Linie unterschiedlich. Inwieweit dies durch eine partielle Verminderung der  $\alpha$ -Gliadine oder durch eine erhöhte Expression der  $\gamma$ -Gliadine, LMW-GS und  $\omega$ -Secaline begründet ist, bleibt zu untersuchen. In einer N-terminalen Ansequenzierung dieser verbliebenen Proteine einer transgenen Probe konnten keine  $\alpha$ -gliadintypischen Sequenzen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine vollständige Eliminierung durch die Expression von dsRNA erreichbar ist. In Nachkommen der GliaRNAi-OU exprimierenden Linien #159 und #170 waren bereits in den SDS-PAGE-Untersuchungen unterschiedliche Phänotypen zu beobachten. Um die Frage abschließend zu klären, ob auch hier in den Karyopsen die  $\alpha$ -Gliadine vollständig eliminiert sind beziehungsweise wie hoch der  $\alpha$ -Gliadin-Gehalt ist, müssen weitere Proben untersucht werden. Möglich ist ebenfalls, dass andere Speicherproteine verstärkt exprimiert werden. In Reis wird bei der dominanten Mutation *low glutelin content1* eine Kompensation der Glutelinreduktion durch eine gesteigerte Expression anderer Speicherproteine beobachtet (Kusaba *et al.*, 2003). Auch in einem Antisense-Ansatz zur Reduzierung des Glutelingehaltes wurde diese Verringerung von einem erhöhten Prolamingehalt begleitet. Ein signifikanter Unterschied im Gesamtproteingehalt zwischen transgenen und Wildtyp-Pflanzen konnte nicht festgestellt werden (Maruta *et al.*, 2001).

In der Literatur werden für ins Genom stabil integrierte dsRNA exprimierende Konstrukte variierende Phänotypen beobachtet. Diese Unterschiede reichen von einer geringen bis zur vollständigen Inhibition der Genexpression (Chuang und Meyerowitz, 2000; Levin *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Stoutjesdijk *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2002; Wang und Wagner, 2003; Ogita *et al.*, 2003). Während Antisenseund Cosuppressions-Konstrukte überwiegend schwache bis mittlere moderate Phänotypstärken entstehen lassen, führen sowohl hp- als auch ihpRNA exprimierende Vektoren zu einem höheren Niveau der Phänotypstärke.

In den verschiedenen untersuchten GliaRNAi-Spacer-Linien konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl integrierter Transgenkopien und dem Ausmaß der α-Gliadin-Reduktion erkannt werden. Die Variation des Reduktionsumfangs in den RP-HPLC-Analysen innerhalb der Nachkommen einer Linie konnte in allen Linen, unabhängig von der Anzahl der Transgenkopien, festgestellt werden. Während eine positive Korrelation zwischen der Anzahl integrierter Genkopien und der Stärke des Phänotyps für Cosuppressions- und Antisense-Ansätze kontrovers diskutiert wird, wurde ein solcher Einfluss bislang in Arbeiten anderer Gruppen für RNA Silencing durch dsRNA exprimierende Vektoren nicht beschrieben (zur Übersicht: Mol *et al.*, 1994; Bourque, 1995; Meyer und Saedler, 1996; Waterhouse *et al.*, 1998). Im Zusammenhang mit transienten Untersuchungen durch Applikation verschiedener RNA-Moleküle und der Induktion von Cosuppression durch Transgene wird ein Schwellenwert-Effekt postuliert, bei dem ein Minimum an dsRNA pro Zelle ausreicht, um den RNA-Silencing-Mechanismus auszulösen (Schweizer *et al.*, 2000; Crete und Vauchert, 1999; English und Baulcombe, 1997).

## 4.3 Auswahl der Zielsequenz

Für die Auswahl der Zielsequenz wurde ein Vergleich von 29  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank durchgeführt. Aufgrund der hohen Übereinstimmung zwischen den  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen nach dem Translationsstart und geringer Sequenzhomologien zu anderen Speicherproteinen wurde dieser Abschnitt für die Klonierung in die GliaRNAi-Vektoren ausgewählt. Ein 313 bp-Fragment wurde durch PCR aus genomischer DNA und Karyposen-cDNA amplifiziert und kloniert.

Im 5' Bereich des Translationsstarts der  $\alpha$ -Gliadine treten fünf verschiedene Typen von  $\alpha$ -Gliadin-Sequenzen auf. Der klonierte, 313 bp lange Bereich zeigt zu allen einzelnen Grundtyp-Sequenzen mehrere, mindestens 29 bp lange Abschnitte mit einer 100% igen Übereinstimmung der Basensequenz. Es besteht somit die theoretische Möglichkeit zur Bildung von siRNAs mit Sequenzidentität zu den Vergleichssequenzen.

Während Vektoren für Cosuppressions-Ansätze meist die gesamte Sequenz des Zielgens in sense-Orientierung enthalten, gibt es weder für Antisense- noch für RNAi-Vektoren in der Literatur eine einheitliche Meinung darüber, welche Regionen oder Längen als Zielsequenz optimale Ergebnisse versprechen. In Antisense-Strategien wurden sowohl vollständige Gensequenzen als auch partielle Sequenzen aus allen Bereichen der Gene verwendet (zur Übersicht: Bourque, 1995). Für die in der Literatur beschriebenen RNAi-Ansätze in Pflanzen wurden Zielsequenzen von etwa 100 bis 860 bp verwendet. Die Sequenzen stammten aus allen Bereichen der codierenden Sequenz und aus 5' und 3' UTRs des Zielgens (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Chuang und Meyerowitz, 2000; Levin *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001; Zentella *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2002; Stoutjesdijk *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2003; Teerawanichpan *et al.*, 2003; Wang und Wagner, 2003; Ogita *et al.*, 2003; Lawrence und Pikaard, 2003).

In bereits zu Beginn dieser Arbeit veröffentlichten Untersuchungen besaßen die dsRNAs Sequenzen mit vollständigen Homologien zu den Zielgenen. Es wurde angenommen, dass durch die Auswahl entsprechend spezifischer Sequenzen gezielt die Geninaktivierung eines einzelnen Allels möglich ist. Es lagen keine Informationen darüber vor, inwieweit das Silencing mehrerer Gene einer Familie möglich ist beziehungsweise inwieweit das sequenzspezifische Gene Silencing durch dsRNA Differenzen zwischen der Sequenz der dsRNA und dem Zielgen toleriert.

Elbashir *et al.* (2001) konnten in einem Drosophila *in vitro* System zeigen, dass bereits die Zugabe einer einzelnen synthetischen 21 nt oder 22 nt langen siRNAs eine sequenz-

spezifische mRNA-Degradation auslöst und somit zu einem PTGS führt. Dass auch in Pflanzen bereits durch die Existenz von einzelnen siRNA mit einer spezifischen Sequenz eine Geninaktivierung und ein systemisches Silencing induziert wird, zeigten Vanitharani et al. (2003) und Klahre et al. (2002). Welche strukturellen Merkmale der siRNA-Duplex Voraussetzung für eine effiziente Geninaktivierung sind, ist noch weitestgehend unbekannt. Aktuelle Berichte, zumeist aus tierischen Systemen, bieten inzwischen Hinweise durch die Verwendung verschiedenster modifizierter RNA-Moleküle. Es wird angenommen, dass ein optimales Gene Silencing eine perfekte Sequenzhomologie zur Zielsequenz erfordert. Abhängig von der Position eines Nukleotid-Mismatches innerhalb der siRNA entsteht durch ein mehr oder weniger vollständiges PTGS ein unterschiedlicher Phänotyp. Mutationen am 5' Ende wurden toleriert, während Modifikationen im 3' Bereich zum Funktionsverlust der siRNAs führten (Elbashir et al., 2001; Pusch et al., 2003; Czauderna et al., 2003). Ein entscheidender Schritt für RNAi ist die Formation von RISC. Dieser Protein-siRNA-Komplex vermittelt erst die Degradation der Ziel-mRNA. Neue Untersuchungen zeigten, dass eine funktionelle Asymmetrie der siRNA-Duplex möglich ist, wodurch nur ein RNA-Strang RNAi auslösen kann. Dieses weist auf die entscheidende Bedeutung der sowohl absoluten als auch relativen thermodynamischen Eigenschaften der Basenpaarungen bzw. der Duplex hin (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003; Matveeva et al., 2003) und damit auf deren Berücksichtigung bei der Auswahl der Zielsequenz.

# 4.4 Vererbung und Stabilität des Phänotyps

Für konsistente Analyseergebnisse und eine anwendungsorientierte Herstellung von Gene Silencing-Pflanzen spielt die Stabilität des Phänotyps eine entscheidende Rolle. Diese Stabilität bezieht sich sowohl auf die Erhaltung des Phänotyps in nachfolgenden Generationen und auf die Produkte aus Kreuzungen als auch auf die Beständigkeit unter verschiedenen Umweltbedingungen oder Stresssituationen.

Die Analysen von T<sub>2</sub>-Nachkommen der GliaRNAi-Spacer transgenen T<sub>0</sub>-Linien #6, #7, #16 und #30 zeigten die stabile Vererbung des Silencing-Phänotyps. Die Stabilität des erzeugten Phänotyps ist essenziell für reproduzierbare Ergebnisse, zum Beispiel für Genfunktionsanalysen, aber auch im Hinblick auf die angewandte Nutzung dieser Technik in der Landwirtschaft. Bei Verwendung von gliadinfreiem Weizen in Nahrungsmitteln für Zöliakie-Patienten ist eine mangelnde Stabilität des Merkmals ein Ausschlusskriterium. Im Gegensatz zu den Cosuppressions- und Antisense-Konstrukten konnte für die durch hpRNA- und ihpRNA exprimierenden Konstrukte erzeugten PTGS-Phänotypen eine Beständigkeit bei Vererbung und Kreuzung gezeigt werden. Chuang und Meyerowitz (2000) zeigten in Arabidopsis, dass die Vererbung stabil integrierter dsRNA exprimierender Konstrukte mit homologen Sequenzen zu den endogenen Genen *AGAMOUS* und *CLAVATA3* für die T<sub>2</sub>-Generation nach Mendel erfolgte. Der RNAi-Effekt persistierte in den neuen Generationen oder entstand neu. Stoutjesdijk *et al.* (2002) zeigten ebenfalls bis in die T<sub>5</sub>-Generation von Arabidopsis-Pflanzen eine stabile Vererbung eines ihpRNA exprimierenden Konstruktes gegen das endogene  $\Delta$ 12-Desaturase-Gen. Liu *et al.* (2002) konnten gleichzeitig die Expression der  $\Delta$ 9-Desaturase SAD-1 und der  $\Delta$ 12-Desaturase FAD2-1 in Baumwollsamen reduzieren. Dieses gelang ihnen durch die Herstellung von PTGS-Linien mit hpRNA exprimierenden Konstrukten gegen das Gen der  $\Delta$ 9-Desaturase SAD-1 oder gegen das Gen der  $\Delta$ 12-Desaturase FAD2-1 und anschließende Kreuzung der Linien. Der entstandene Phänotyp entsprach für beide Merkmale den parentalen Gene Silencing-Ausprägungen.

Szittya und Mitarbeiter (2003) beobachteten, dass ein Stressfaktor, wie tiefe Temperatur, Transgen induziertes PTGS inhibiert und ein Verschwinden von phänotypischen Veränderungen zur Folge hat. Sie konnten für die drei dikotylen Pflanzen Tabak, Arabidopsis und Kartoffel zeigen, dass siRNA vermitteltes RNA Silencing temperatur-abhängig ist und dieser Effekt sowohl bei Virus induced Gene Silencing (VIGS) als auch bei dsRNA und antisense-RNA induziertem PTGS auftritt. Die Menge der siRNAs nimmt mit sinkender Temperatur ab und die Transkriptmenge des Zielgens dagegen zu. Bei steigender Temperatur wird das RNA-Silencing aktiviert und die Menge der siRNAs nimmt zu. Dieser Bericht ist bisher der einzige, der einen Einfluss der Temperatur auf Transgen induzierte PTGS-Phänotypen aufzeigt.

Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen und es nicht gelingen, Linien mit einem unter verschiedenen Umweltbedingungen stabilen Phänotyp zu selektieren, kann dies Auswirkungen auf die kommerzielle Nutzung solcher Pflanzen haben. Metzlaff (Bayer BioScience Gent, mündliche Mitteilung) konnte im Gegensatz zu Szittya *et al.*, (2003) für VIGS in Tabak keine temperaturabhängigen Veränderungen feststellen. Diese widersprüchlichen Beobachtungen verdeutlichen, dass der Faktor Stress auf die Ausprägung von Gene Silencing weiter untersucht werden muss.

## 4.5 Ausblick

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen am Beispiel der  $\alpha$ -Gliadine, dass durch RNA Interference die posttranskriptionale Geninaktivierung einer Genfamilie möglich ist. Der gewählte Ansatz hat sich in Weizen als sehr effizient erwiesen und stellt eine geeignete Alternative zu konventionellen Cosuppressions- und Antisense-Ansätzen dar.

Mit Hilfe dieser Methode ist es grundsätzlich denkbar, die Expression der übrigen  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadin-Gene zu inhibieren, um einen gliadinfreien Weizen zu erzeugen. Die  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadine zeigen, wie die  $\alpha$ -Gliadine innerhalb der einzelnen Gene einer Genfamilie, eine sehr hohe Sequenzhomologie, die einen Erfolg versprechenden Ansatzpunkt für eine RNAi-Strategie zur Geninaktivierung bietet.

Zu Beginn der Arbeit galten in Weizen lediglich die Gliadine als Zöliakie auslösend. In einer neuen Veröffentlichung von Molberg und Mitarbeitern (2003) berichten diese über *in vitro* T-Zell-Tests, in denen HMW-gluteninspezifische T-Zellen in Proben von einigen Zöliakie-Patienten identifiziert wurden. Sie vermuten daher, dass die HMW-gluteninspezifischen T-Zellen eine Rolle in der Pathogenese der Zöliakie spielen und stellen deshalb die Nutzung der Weizen HMW-Glutenine in Nahrungsmitteln für Zöliakie-Erkrankte in Frage. Da in den *in vitro* T-Zell-Tests beispielsweise auch *E. coli* Proteine eine positive Reaktion in Lysaten einzelner Patienten auslösten und verschiedene Fragen offen blieben, erscheint eine kritische Betrachtung dieser Arbeit angebracht. Diese Analysen müssen jedoch in jedem Fall durch *in vivo* Untersuchungen an Zöliakie-Patienten überprüft werden, um die Frage abschließend zu klären, ob die Weizen HMW-Glutenine ebenfalls Zöliakie auslösen. Sollten sich diese Ergebnisse bestätigen, ist es notwendig, die Fortführung dieses Projektes zur Erzeugung eines gliadinfreien Weizens als nicht toxisches Lebensmittel für Zöliakie-Patienten zu überdenken.

Die Verwendung von transgenem,  $\alpha$ -gliadinfreiem Mehl in Backversuchen erlaubt erstmals eine direkte Untersuchung des Einflusses der  $\alpha$ -Gliadine auf die Teigbildungseigenschaften von Weizen. Das Erhalten der Teigbildungseigenschaften eines gliadinfreien Weizenmehls ist die Voraussetzung für die Verwendung in Backwaren.

Darüber hinaus ist es denkbar, diesen α-gliadinfreien Weizen mit anderen transgenen Weizenlinien, die veränderte Stärken enthalten, zu kreuzen. Auf diese Weise ließen sich möglicherweise Produkte mit neuen Eigenschaften herstellen, denn für die Backeigenschaften ist neben den Speicherproteinen auch die Stärkezusammensetzung wichtig. Für die Nutzung der RNAi-Technik zur Erzeugung neuer Lebensmittel besteht weiterer Forschungsbedarf im Hinblick auf die Stabilität der Phänotypen unter verschiedenen Umweltbedingungen. Für eine Einordnung des im Zusammenhang mit RNAi auftretenden systemischen Silencing ist ein tieferes Verständnis des dahinter stehenden Mechanismus notwendig. Gleiches gilt für die diskutierten Off-target-Effekte (van Houdt *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003).

Nicht nur in tierischen, sondern auch in pflanzlichen Systemen findet diese Technik zunehmend Verwendung. Dazu gehören Anwendungen im Bereich Reverse Genomics, Aufklärung von Stoffwechselwegen, Untersuchung von Entwicklungsprozessen und angewandte Ansätze wie die Erzeugung von Pathogenresistenzen und Modifikation von Inhaltsstoffen bzw. Biosynthesewegen.

## 5. Zusammenfassung

Die Zöliakie ist eine häufig bereits im Kleinkindalter manifestierte, chronische Verdauungsinsuffizienz. Die Erkrankung tritt vermutlich infolge einer autoimmunologisch begründeten Unverträglichkeit gegenüber bestimmten Speicherproteinen aus Weizen (Gliadine), Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) auf. Das Auftreten der Krankheit ist beschränkt auf Menschen europider Abstammung und ist durch die koloniale Expansion der europäischen Völker auf allen Kontinenten verbreitet. Neue epidemiologische Studien belegen eine Inzidenz von bis zu 1% in Europa.

Die Intoleranz führt zur Schädigung der Dünndarmschleimhaut. Es kommt zu einem Funktionsverlust des Darms und damit verbunden zur Malabsorption. Die Patienten leiden unter anderem an Durchfall und Erbrechen. Aufgrund der Mangelversorgung über einen längeren Zeitraum kommt es zu Folgeerkrankungen wie z. B. Anämie, Auszehrung, Knochenschmerzen, Abgeschlagenheit, psychischen Veränderungen sowie Entwicklungsstörungen bei Kindern.

Da die Erkrankung durch die Aufnahme kleinster Mengen von Gliadinen, Hordeinen oder Secalinen mit der Nahrung ausgelöst wird, ist die bis heute einzige Therapie, unter der sich die induzierten Veränderungen der Darmschleimhaut zurückbilden, ein lebenslanger, strikter Verzicht auf entsprechende Nahrungsmittel.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, als Bestandteil des BMB+F Leitprojektes "Zöliakie" sollte mit Hilfe des RNA Interference (RNAi) versucht werden, die α-Gliadine in Weizen vollständig zu eliminieren. Zu Beginn dieser Arbeit gab es für stabil transformierten Weizen keinen Hinweis auf RNAi induzierte Phänotypen. Die besondere Schwierigkeit der Arbeit bestand darüber hinaus darin, nicht die Expression eines einzelnen Gens, sondern die einer Genfamilie zu inhibieren.

Die Gliadine des Weizens werden in die drei Hauptgruppen, der  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadine unterteilt und bilden zusammen die Gliadin-Superfamilie. Die Anzahl der Gene liegt beispielsweise für die  $\alpha$ -Gliadine je nach Kultivar zwischen 25 und 150, von denen etwa die Hälfte transkribiert wird. Der Anteil der Gliadine liegt bei etwa 30-35% des Gesamtproteingehalts in der Weizenkaryopse.

In der vorgestellten Untersuchung wurde eine 313 bp lange  $\alpha$ -Gliadin-Teilsequenz aus Weizen isoliert und in drei, in ihrem Aufbau unterschiedliche RNAi-Transformationsvektoren kloniert. Die  $\alpha$ -Gliadin-Sequenz wurde in sense- und antisense-Orientierung in
die Vektoren inseriert. Die Transkription der drei unterschiedlichen Vektoren sollte in allen Fällen zur Bildung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) führen, die als Voraussetzung für eine posttranskriptionale Geninaktivierung durch RNAi angesehen wird.

Die Transformationsvektoren wurden anschließend in Skutellumzellen unreifer Weizen-Embryonen mit der biolistischen Transformationsmethode übertragen. Insgesamt wurden 174 unabhängige transgene Weizenpflanzen selektiert. Die Integration und Transkription der drei RNAi-Konstrukte wurde durch Southern- und Northern Blot bzw. RT-PCR in den primär transgenen Pflanzen und z. T. bis in die T<sub>2</sub>-Generation belegt.

Die Analyse der Zusammensetzung der Speicherproteine von transgenen Weizenkaryopsen erfolgte durch RP-HPLC- und SDS-PAGE-Untersuchungen. Für zwei der drei stabil in das Weizengenom integrierten RNAi-Vektoren wurde in den Karyopsen eine deutliche Reduktion der  $\alpha$ -Gliadine nachgewiesen. Mit einem der beiden Genkonstrukte konnte bei allen untersuchten transgenen Pflanzen eine Eliminierung der  $\alpha$ -Gliadine erzielt werden. Für eine transgene Pflanzenlinie wurde durch eine Proteinansequenzierung der Nachweis erbracht, dass die  $\alpha$ -Gliadine vollständig entfernt werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in hexaploidem Weizen durch stabile Transformation mit dsRNA-exprimierenden Transkriptionsvektoren eine posttranskriptionale Geninaktivierung erreicht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es mit dieser Methode möglich ist, die Expression einer Genfamilie komplett zu inhibieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist die Eliminierung der übrigen  $\gamma$ - und  $\omega$ -Gliadine geplant und damit prinzipiell eine Methode zur Erzeugung eines gliadinfreien Weizens entwickelt.

## 6. Anhang

A T G	A A G	A C	с т	т т	с	гс	A	т с	С	тт	G	с	сс	Т	сс	Т	Т	G C	: т	A	т с	G	T G	G	C G	i A	С	C A	. с	C G C		
A T G A T T G G A T T G A T T G G A T T G A T T G G A T T T T T G G A T T T T G G A T T T T T T G G A T T T T T T T T G G A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	λ         λ         G         G           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         λ         G         G         A           λ         A         G         G         A           λ         A         G         G         A           λ         A         G         G         A           λ         A         G         G         A           A         A         G         G         A           A         A         G         G         A           A         A         G         G         A	А С С С С С С С С С С С С С С С С С С С		T T T T T T T T T T T T T T T T T T T			A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	TT C C C C C C C C C C C C C C C C C C				000000000000000000000000000000000000000		너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너		T - T T G T T T T T T T T T	30 T T T T T T T T T T T T T T T T T			А – А А А А А А А А А А А А А А А А А А	T C T T C C T T C T T C C T T T C C C T T T C C T T C C C T T T T C C T T T C C C T T T C C C T T T C C C T T T T T C C C T T T T T C C C T T T T T T T T T T T T		T G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	40 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6				C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		50 50 50 50 50 50 50 50 50 50		CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_011073.5E0 CDNA_011073.5E0 CDNA_011075.5E0 CDNA_011075.5E0 CDNA_01076.5E0 CDNA_01076.5E0 CDNA_051303.5E0 CDNA_051304.5E0 CDNA_051304.5E0 CDNA_051305.5E0 CDNA_051305.5E0 CDNA_05126.5E0 CDNA_0526.5E0 CDNA_0526.5E0
сас	а а с	ΤG	C A 60	G T	т.	A G	λ	GТ	Т	с с 70	A	G	ΤG	С	C A	С	A 80	A T	: т	G	с а	G	сс	A 90	C A	A	A	ΑT	С	C A T	0	
C A C C C A C C A C C A C C A C C C C C	A         A         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C           A         A         C         C	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т	T T T T T T T T T T T T T T A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	А	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A				C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A I I A A I A A I I A A I I A A A I I A A A I A A A I A A A I A A A I A A A I A		6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	С С С С С С С С С С С С С С С С С С С	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		А А А А А А А А А А А А А А А А А А А			A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		C A T C C C A T C C A T C C A T C C C A T C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_m10092.5E0 CDNA_m11073.5E0 CDNA_m11074.5E0 CDNA_m11075.5E0 CDNA_m11075.5E0 CDNA_m51076.5E0 CDNA_m513103.5E0 CDNA_m513103.5E0 CDNA_m513103.5E0 CDNA_m513103.5E0 CDNA_m513103.5E0 CDNA_m513
стс	A G C	λÀ	са	G C	c.	A C	A.	A G	А	g c	A	А	GТ	Т	сс	A	Т	T G	G G	Т		- 1	a c	A	A C	A	A	C A	. А	C A A	_	
	À         G         C           A         G         C           A         G         C           A         G         C           A         G         C           A         G         C           A         A         G         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C           A         G         C         C	C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A	G G C C C C C C C C C C C C C C C C C C		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		20 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A					G C	- 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1	А С С С С С С С С С С С С С С С С С С С	140 А А А А А А А А А А А А А А А А А А А		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		C A A A C C A A C A A C A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C A A A C C C C A A A C	0	CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_n10092.5E0 CDNA_n11073.5E0 CDNA_n11073.5E0 CDNA_n11075.5E0 CDNA_01076.5E0 CDNA_01076.5E0 CDNA_0151305.5E0 CDNA_013104.5E0 CDNA_013104.5E0 CDNA_013105.5E0 CDNA_0130.5E0 CDNA_0130.5E0 CDNA_0130.5E0 CDNA_02065.5E0
т т т	сса	G G	G C	A G	с	A A	c.	A A	с	C A	Т	Т	тс	С	A C	С	A	сA	A	c.	A G	C (	са	Т	A I	с	с	g C	A	G C C	-	
T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	$\begin{array}{cccc} C & A \\ C & C \\ C & A \\ C & C \\ C$	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	160 6 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A G G G G G G G G G G G G G G G G G G G		******		凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡凡		70 A A A C A A A A		T T T T T T T T T T T T T T T T T T T			А СССА СССА СССА СССА СССА СССА СССА С		180 АААААААААААААААААААА	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A G G G A A G G A A A A A A G G G A		C C A A A A A A A A A A A A A A A A A A	190 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	А Т А Т А Т А Т А Т А Т А Т А Т А Т А Т		000000000000000000000000000000000000000	G C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	А А	20 G C C G C C C A A C C C C C C C C C C C C C		CDNA_F03074.SEQ CDNA_F03075.SEQ CDNA_m10092.SEQ CDNA_m11073.SEQ CDNA_m11074.SEQ CDNA_m11075.SEQ CDNA_m1076.SEQ CDNA_M02874.SEQ CDNA_M51303.SEQ CDNA_M51304.SEQ CDNA_M51304.SEQ CDNA_M51304.SEQ CDNA_M51305.SEQ CDNA_M51305.SEQ CDNA_M51305.SEQ CDNA_M51205.SEQ CDNA_M5205.SEQ CDNA_M5205.SEQ
GCA	АСС	A T	тт	с с	A	т с	λ	са	A	C A	A	С	сa	T	АT	С	T	G C	: A	G	с т	G (	C A	A	сс	A	Т	тт	с	c g c	_	
A       A	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	А А Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т	210 T		А А А А А А А А А А А А А А А А А А А		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	СССССССССССССССССССССССССССССССССССССС	2 АААААААААААААААААААА	C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A			C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	네 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너 너	А Л Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т Т	00000A - 000000000000000000000000000000	230 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T			A G G G G G G G G G G G G G G G G G G G			CCAACCAA CCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	240 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		A A A A A A A A A A A A A A A A A A A				25) C A C G G C C A C C A C C A C C A C C A C C C A C C C C		CDNA_k01074.EE cDNA_k01075.EE cDNA_a101075.EE cDNA_a11073.EE cDNA_a11073.EE cDNA_a11075.EE cDNA_a11075.EE cDNA_u1076.EE cDNA_u51303.EE cDNA_u51303.EE cDNA_u51304.EE cDNA_u51304.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51305.EE cDNA_u51205.EE cDNA_U51205.EE cDNA_U51205.EE cDNA_U51205.EE cDNA_U51205.EE cDNA_U51205.EE cDNA_U51205.EE

# 6.1 Vergleich von 18 GenBank α-Gliadin-Sequenzen

АССССААС	C A T - T C - G C		G C À G C C G C À À	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	280 A G C C G C A A C T A C C A T A G C C G C A A C T A C C A T A G C C G C A A C T A C C A T A G C C G C A A C T A C C A T A G C C G C A A C T A C C A T A G C C G C A A C T A C C A T	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	cDNA_k03074.5E0 cDMA_k03075.5E0 cDMA_h1032.5E0 cDMA_m11032.5E0 cDMA_m11032.5E0 cDMA_m11075.5E0 cDMA_m11075.5E0 cDMA_m1075.5E0 cDMA_u0227.5E0 cDMA_u027.5E0 cDMA_U027.5E0 cDMA_U027.5E0 cDMA_U027.5E0 cDMA_U027.5E0 cDMA_
СТАССАТАТ	т С G С А G С С А С А А	C C A T T T C G A C C A C A A	СААССАТАТССАСА	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	C       C       A       T       T       T       T       T       T       C       A       C       C       A       C       A       A       A       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A       A       A       C       C       A	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03073.5E0 CDNA_m1002.5E0 CDNA_m11073.5E0 CDNA_m11073.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_u05287.5E0 CDNA_u50984.5E0 CDNA_u51306.5E0 CDNA_u51306.5E0 CDNA_u51306.5E0 CDNA_u51306.5E0 CDNA_u51306.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_u512540.5E0
ACCGCAACC	а са 6 та ттс 6 са 360 - 370	ассасаасаассаат 380	T T C G C A G C A G C A G -	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A       C       C       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       C       A       A       T         A       C       C       A       A       C       A       A       C       C       A       A       T       A       A       C       C       A       A       T       A       A       C       C       A       A       T       A       A       C       C       A       A       T       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       T       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A       C       C       A       A	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_m1002.5E0 CDNA_m1073.5E0 CDNA_m1073.5E0 CDNA_m1074.5E0 CDNA_m1074.5E0 CDNA_u51984.5E0 CDNA_u51303.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u5140.5E0 CDNA_U5140.5
C A G C A G C		алсалсалсалсалс	аасаасаасаа	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	410     420     420       2 <t< td=""><td>HAM       C       A       A       C</td><td>440     440     440       A     C     A     A     A     <t< td=""><td>CDNA_k03074.5EQ CDNA_k03075.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m11033.5EQ CDNA_m11073.5EQ CDNA_m11075.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u52540.5EQ</td></t<></td></t<>	HAM       C       A       A       C	440     440     440       A     C     A     A     A <t< td=""><td>CDNA_k03074.5EQ CDNA_k03075.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m11033.5EQ CDNA_m11073.5EQ CDNA_m11075.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u52540.5EQ</td></t<>	CDNA_k03074.5EQ CDNA_k03075.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m10392.5EQ CDNA_m11033.5EQ CDNA_m11073.5EQ CDNA_m11075.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51303.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u51305.5EQ CDNA_u52540.5EQ
саасааатс	СТТСААСАААТТ 460 470	ТТ G С А А С А А С Т G 480	ATTCCATGCAGGGA 490 500	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	T       T       G       C       A       A       C       A       A       C       T       G       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       T       G       C       T       G       C       A       A       C       T       G       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       T       G       C       A	A         T         T         C         C         A         T         G         C         A         G         C         A         G         C         A         G         C         A         G         C         A         G         G         A         A         A         T         T         C         C         A         T         G         C         A         G         C         A         G         C         A         G         A         C         A         T         T         C         C         A         T         G         C         A         T         G         C         A         G         A         T         T         C         C         A         T         G         C         A         G         A         T         T         C         C         A         T         G         C         A         G         C         A         G         C         A         C         A         C         C         A         C         C         A         C         C         A         C         C         A         C         C         A         C         C         A	CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_m10092.5E0 CDNA_m1073.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_m1075.5E0 CDNA_u51303.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_w13136.5E0 CDNA_w13136.5E0 CDNA_w1365.5E0 CDNA_w1365.5E0 CDNA_w1365.5E0 CDNA_w1365.5E0 CDNA_w1256.5E0 CDNA_W1256.5E0 CDNA_
TGTTGTÀTT	дсаасаасасаа 510 520	САТА G С G С А Т G G А A G 530	стсасаадттттд с 540 550	
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	G         C         A         A         C         A         A         C         A         C         A         C         A         A         C         A         C         A         C         A         A         C         A         C         A         A	C       A       T       A       G       C       G       C       A       T       G       C       A       T       G       C       A       T       G       C       A       T       G       C       A       A       T       G       C       A       T       G       C       A       A       G       C       A       T       G       C       A       A       G       C       A       T       G       C       A       A       G       C       A       T       A       G       C       C       A       T       G       G       A       A       G       C       A       T       G       G       A	A       T       C       A       C       A       A       G       T       T       T       G       C         C       T       C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       T       C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       T       C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       T       C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       A       C       A       A       G       T       T       T       T       G       C         C       A       C       A       A       G       T       T       T       G       C         A       T       C       A       C       A	CDNA_k03074.5E0 CDNA_k03075.5E0 CDNA_m1002.5E0 CDNA_m11073.5E0 CDNA_m11073.5E0 CDNA_m11074.5E0 CDNA_m11074.5E0 CDNA_u51984.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51304.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_u513105.5E0 CDNA_u513105.5E0 CDNA_u513105.5E0 CDNA_u51305.5E0 CDNA_U51305.

# Anhang

AACAAA	G T A C T T A C	С А G С Т G Т Т	г д с а а с а а т т д т д т т д т с а д с а с с т д т д д	
	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	580       550       600         I G C A A C A A T T G T G T G T T G T C A A C A G C T G T G G G T G C A A C A A C A A T T G T G T G T T G T C A A C A A C T G T G T G G T G C A A C A A C A A T T G T G T G T T G T C A A C A A C T G T G T G G T G G G C A G C T G T G T G G T G C A A C A A C A A T T T G T C T G T C A A C A A C A A C T G T G G T G G G C A G C A G C T G T G G G G C A C C T A T G G G G G G G G G G G G G G G G G	CDNA_k03074.SE0 CDNA_k03075.SE0 CDNA_k03075.SE0 CDNA_B1097.SE0 CDNA_B1097.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_B1075.SE0 CDNA_S02540.SE0 CDNA_k02068.SE0
CAGATC	C C T G A G C A	GTCGCAGT 620		
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	I         G         C         C         A         T         C         A         T         C         A         T         G         T	cDNA_k03074.SE0 cDNA_k03075.SE0 cDNA_m1092.SE0 cDNA_m11073.SE0 cDNA_m11073.SE0 cDNA_m11075.SE0 cDNA_m11075.SE0 cDNA_m1076.SE0 cDNA_m10764.SE0 cDNA_m10764.SE0 cDNA_m10764.SE0 cDNA_m10764.SE0 cDNA_m10775.SE0 cDNA_m1111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m11111.SE0 cDNA_m111111.SE0 cDNA_m11111111.SE0 cDNA_m111111111111111111111111111111111111
таттат	ТСТ G С А Т С 660	л л С л л – – – 670	680 690 700	
	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A         A         C         A         A         G         A         A         G         A         A         C         A         A         G         A         A         C         A         A         C         A         A         C         A         A         C         A         A         C         A         A         C         A         A         C         C         A         C         C         A	A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       A       C       A       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       C       A       A       A       C       A       A       A       A	CDNA_k03074.SE0 CDNA_k03075.SE0 CDNA_B10092.SE0 CDNA_B11073.SE0 CDNA_B11073.SE0 CDNA_B11075.SE0 CDNA_B11075.SE0 CDNA_B11075.SE0 CDNA_B11075.SE0 CDNA_B1303.SE0 CDNA_B1303.SE0 CDNA_B1303.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S1305.SE0 CDNA_S12055.SE0
T G C À À C T C C À À C T C C À À C T C C A A C T C C A C A A C T C C A C C A C T C C A C C A C T C C C A C C A C T C C C A C C C C C C C C C C C C C C C	A         A         C         A         A         C         A           A         A         C         A         A         C         A           A         A         C         A         A         C         A           B         A         C         A         A         C         A           B         C         A         A         C         A         A           C         A         A         C         A         A         C         A           C         A         C         A         C         A         A         C         A           C         A         C         A         C         A         C         A           C         A         C         A         C         A         C         A           C         A         C         A         C         A         C         A           C         A         C         A         C         A         C         A           C         A         C         A         C         A         C         A           C         C         C	C A A C A G C A C A A C A G C A C A C A C A G C A C A C A C A A C A C A C A C A A C A 	A       A       C       T       C       A       C       A       C       A       C       A       A       C       A       A       A       C       A	cDNA_k03074.SEQ cDNA_k03075.SEQ cDNA_m10092.SEQ cDNA_m11073.SEQ cDNA_m11074.SEQ cDNA_m11075.SE0
T G C A A C T G C A A C	A       A       C       A       A       C       A         -       -       -       -       -       -       A         -       -       -       -       -       -       -       -         -       -       -       -       -       -       -       -       -         -       -       -       -       -       -       -       -       -         -       -       -       -       -       -       -       -       -         -       -       -       -       -       -       -       -       -       -         -       -       -       -       -       -       -       -       -       -         -	C A A C A G C A 	-     - <td>CDNA_u08287.SEC CDNA_u08287.SEC CDNA_u50984.SEC CDNA_u51303.SEC CDNA_u51304.SEC CDNA_u51304.SEC CDNA_u51306.SEC CDNA_u51306.SEC CDNA_x0627.SEC CDNA_x17361.SEC CDNA_x17361.SEC CDNA_k02068.SEC</td>	CDNA_u08287.SEC CDNA_u08287.SEC CDNA_u50984.SEC CDNA_u51303.SEC CDNA_u51304.SEC CDNA_u51304.SEC CDNA_u51306.SEC CDNA_u51306.SEC CDNA_x0627.SEC CDNA_x17361.SEC CDNA_x17361.SEC CDNA_k02068.SEC
T G C A A C A A C	A         C         A         C         A         C         A           -	C         A         C         A         C         A         G         C         A           C         A         C         A         G         C         A           -         -         -         -         -         -         -         -           -         -         -         -         -         -         -         -         -           -         -         -         -         -         -         -         -         -           -	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	CDNA_m110'76.SEO CDNA_u0287.SEO CDNA_u5984.SEO CDNA_u51303.SEO CDNA_u51304.SEO CDNA_u51304.SEO CDNA_u51307.SEO CDNA_u51307.SEO CDNA_u51130.SEO CDNA_u5130.SEO CDNA_u5130.SEO CDNA_u5260.SEO
Image: 1       Image: 2       Image: 2 <td< td=""><td><math display="block"> \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc</math></td><td>-         -</td><td>Image: constraint of the straint of the str</td><td>CDNA_012176.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_0130.5E0 CDNA_02050.5E0 CDNA_020</td></td<>	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	-         -	Image: constraint of the straint of the str	CDNA_012176.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_013175.5E0 CDNA_0130.5E0 CDNA_02050.5E0 CDNA_020
I       0       0       1       0         I       0       0       0       0         I       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0       0       0       0       0         I       0       0       0       0       0       0       0       0       0         I       0	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	-         -	-       -	CDNA_b11076.5E0 CDNA_b11076.5E0 CDNA_b11076.5E0 CDNA_b1107.5E0 CDNA_b107.5E0 CDNA_b107.5E0 CDNA_b1107.5E0 CDNA_b1107.5E

А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	A	A A		
T C T C T T T T T C T T T T T C C C	Τ	А А А А А А А А А А А А А А А А А А А А		
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A		с соссоссоссоссос	
	Т	0 0000000000000000000000000000000000000	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	
	Т			
6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	
C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	С	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	
T ( T ( T ( T ( T ( T ( T ( T (			C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	
	-	9 9 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	-
60 66 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 6 - 7 6 6 6 6	-			
A - A - A - A - A - A - A - A A A	-	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	
C - C C C	-	А А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	
C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	-	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	λ	А А А А А - А А А А А А А А А А А А А А	c ccccccccccccccccc	
сссс - сссссссссс с	с	6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	c ccccccccccccccccc	
	с	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	λ λλλλλλλλλλλλλλλ	
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A	с сссс <mark>в</mark> сссссссссссс	G A A G A G G G G G G G G G A A	
T T T T T T T T T T T T T T T T T T	Т	G A G G G G G G G G G G G G G G G G G G	C CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	
	Т	c	c cccccccccccccccc	
970 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	G	7 920 TTTT TTTTTTTTTTTTTTTTT	T 870 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	
	С	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		
G G T G - T G G G G G G G G G T G G	G	0 0000 00000000000000000000000000000000	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	
0000 0000000000000000000000000000000000	С	0 0000100000000000000000000000000000000	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	
с с с с с с с с с с с с с с с с	с	T T T T T T T A T T T T T T T T T T T T	C CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A	G A G G G G G G G G G G G G G G G G G G	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	
	Т	с сссс-сссссссссс	а ададаа ада ададаа ада адада а ада ада ада а а ада ада ада ада ада а ада а а а а а а а а а а а а а а а а а а а	
	Т	л ллллллллллллллллл	C T C C C C C C C C C C C C C C C C C C	
T ( T ( T ( T ( T ( T ( T ( T (	T (	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T ( T (	
9 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	G	T 9 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	G 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	
×0 66666 666666666666666666666666666666	G	6 30 6666666666666666666666666666666666	C 80 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	
	с	T T T T T - T T T T T T T T T T T T T T	c cccccccccccccccccc	
А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	A	G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	c cccccccccccccccc	
T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	Т			
	с	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	а ааааааааааааааааааааааааааааааааааа	
	Т	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	
	Т		T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	
	с	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	TTTTTTTTTTTTTT	
	G (	T ( T ( T ( T ( T ( T ( T ( T ( T ( T (		
	G (	9		
	r :			
A ( ) A ( )	A C	A C A 3 A C A 3 A C A 3 A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C		
	: т		5 A 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	: A		. A . A . A . A . A . A . A . A . A . A	
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	Α		А А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	
00000000000000000000000000000000000000	с	0 0000 1 000000000000000000000000000000		_
T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	Т	0 0000 00000000000000000000000000000000	А А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	
00000000000000000000000000000000000000	G	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	А А А А А А А А А А А А А А А А А А А А	-
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A	с сссс - ссссссссссс	6 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	
		0 950 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	
CDNA_ CDNA_		eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_ eDNA_	CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_ CDNA_	
k0307 n1009 n1107 m1107 m1107 u0828 u5098 u5130 u5130 u5130 u5130 x0062 x0113 x1736 x0254 k0206		k0307 n1009 n1107 n1107 u0828 u5030 u5130 u5130 u5130 x0062 x0113 x1736 x0254 k0206	k0307 n1009 n1107 n1107 n1107 u0828 u5098 u5130 u5130 u5130 u5130 u5130 x0062 x0113 x0062 x0113 x1736 x0254	
4.SE 5.SE 2.SE 3.SE 4.SE 5.SE 6.SE 7.SE 4.SE 4.SE 0.SE 1.SE 0.SE 8.SE		4.SE 5.SE 6.SE 7.SE 4.SE 6.SE 7.SE 4.SE 6.SE 7.SE 0.SE 1.SE 0.SE 8.SE	4.SE 5.SE 2.SE 4.SE 5.SE 6.SE 7.SE 4.SE 6.SE 7.SE 0.SE 0.SE 8.SE	
			222222222222222222222222222222222222222	7

#### Abbildung 20: Vergleich von 18 GenBank α-Gliadin-Sequenzen aus Triticum aestivum L.

Clustal Alignment der GenBank Sequenzen K02068, K03074, K03075, M10092, M11073, M11074, M11075, M11076, U08287, U50984, U51303, U51304, U51306, U51307, X00627, X01130, X02540 und X17361 mit DNAStar MegAlign-Software. Dargestellt sind die abgeleitete Konsensussequenz und die Stärke der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen. Die rote Markierung steht für eine 100%ige Homologie der betreffenden Base. Orange steht für die gleiche Base bei 15-17 der 18 Sequenzen, Grün bei 12-14 und Blau bei 11-8 Sequenzen.

## 6.2 Anteil der Proteine in der α-Gliadin enthaltenden Fraktion

GliaRNAi-Spacer T <sub>1</sub> -Pflanze	Anteil der α-Gliadin enthaltenden Fraktion an den Gliadinen (in %)
5/5	19,6
5/6	22,4
5/8	20,4
6/1	22,5
6/2	14,3
6/6	16,4
6/8	18,1
6/11	24,0
6/12	15,7
6/15	12,3
6/16	16,0
6/19	15,1
6/24	15,1
6/25	22.1
6/26	24.2
7/1	19.6
7/3	22.1
7/5	18.8
7/14	17.8
7/14	21.5
7/21	19.7
7/21	24.4
7/31	25.4
10/1	25,4
10/1	20,0
11/1	17,2
11/2	22,8
11/5	21.9
11/0	21,8
11/15	18,5
11/17	13,1
11/22	22,5
11/25	10.2
16/4	19,2
10//	18,4
16/9	30,1
16/12	20,5
16/15	23,0
16/17	24,3
26/6	21,5
26/9	18,1
30/1	19,9
30/3	27,4
30/4	28,4
30/5	16,5
30/6	18,0
30/10	14,5
30/14	22,2
30/17	21,5
30/19	13,3
30/21	18,0
30/22	25,9
30/23	20,2
30/24	20,5

GliaRNAi-Spacer T1-Pflanze	Anteil der α-Gliadin enthaltenden Fraktion an den Gliadinen (in %)
30/26	17,2
30/28	19,8
42/11	19,6
42/19	24,9
44/3	25,7
44/4	25,2
44/5	14,9
44/18	18,3
44/28	22,3
48/4	25,6
48/19	18,2
48/24	21,1
48/27	17,0
48/28	20,6
51/11	17,8
51/12	22,0
51/16	31,6
51/17	22,7
51/18	21,0
53/2	34,0
53/5	33,2
53/6	32,7
53/14	27,4
53/22	35,3
55/3	25,7
55/5	18,2
55/6	26,8
55/15	31,5
55/28	19,3
55/30	29,5
60/9	12,3
63/4	17,8
63/6	16,1
63/7	16,6
63/12	15,4
63/19	16,0
63/20	14,1
63/21	18,7

#### Tabelle 5: Anteile der α-Gliadin enthaltenden Fraktion transgener GliaRNAi-Spacer-Karyopsen

Ergebnisse aller untersuchten Karyopsen der GliaRNA-Spacer-Linien #5, #6, #7, #10, #11, #16, #26, #30, #42, #44, #48, #51, #53, #55, #60 und #63. Die GliaRNAi-Spacer-Linien #5, #6, #10 und #11 sind klonal. Die prozentualen Anteile der Proteine in der  $\alpha$ -Gliadin enthaltenden Fraktion beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge in der Gliadin-Fraktion. Die Quantifizierung erfolgte durch die Berechnung des prozentualen

Anteils an der Peakfläche der Chromatogramme nach RP-HPLC-Analyse.

#### 7. Literaturverzeichnis

Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK (1997). Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. Nat Biotechnol 14: 1155-1159.

Anderson OD, Greene FC (1997). The  $\alpha$ -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. Theor Appl Genet 95: 59-65.

Anderson OD, Litts JC and Greene FC (1997). The  $\alpha$ -gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat  $\alpha$ -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. Theor Appl Genet 95: 50-58.

Anderson OD, Hsia CC, Torres V (2001). The wheat  $\gamma$ -gliadin genes: characterization of ten new sequences and further understanding of  $\gamma$ -gliadin gene family structure. Theor Appl Genet 103: 323-330.

**Angell SM, Baulcombe DC** (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. EMBO J 16: 3675-3684.

Arentz-Hansen EH, McAdam SN, Molberg Ø, Kristiansen C, Sollid LM (2000). Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. Gut 46: 46-51.

Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, Bartlett WT, Inveradi L, Le TT, thi Man N, Morris GE, Bogan DJ, Metcalf-Bogan J, Kornegay JN (2000). *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. Nat Biotechnol 18: 615-622.

Bass BL (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101: 235-238.

Bass BL (2001). RNA interference: The short answer. Nature 411: 428-429.

**Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H** (1982). Nucleotide sequence and exact location of the neomycin phosphotransferase gene. Gene 19: 327-336.

**Becker D, Brettschneider R, Lörz H** (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant J 5: 299-307. **Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD** (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. Proc Natl Acad Sci USA 96: 8774-8778.

**Bietz JA, Huebner FR, Sanderson JE, Wall JS** (1977). Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. Cereal Chem 54: 1070-1083.

**Bietz JA, Shepherd KW, Wall JS** (1975). Single-kernel analysis of glutenin: use in wheat genetics and breeding. Cereal Chem 52: 513-532.

**Blechl AE, Anderson OD** (1997). Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. Nat Biotechnol 14: 875-879.

**Böcker W, Denk H, Heitz PU** (2001). Pathologie 2. Auflage. Urban&Fischer, München und Jena.

**Bourque JE** (1995). Antisense strategies for genetic manipulations in plants. Plant Sci 105: 125-149.

**Branlard G, Autran JC, Monneveux P** (1989). High molecular weight glutenin subunits in durum wheat (*Triticum durum*). Theor Appl Genet 78: 353-358.

**Bullock WO, Ferandez JM, Short JM** (1987) X11-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. BioTechniques 5: 376-379.

**Cassidy BG, Dvorak J, Anderson OD** (1998). The wheat low-molecular weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene familiy structure. Theor Appl Genet 96: 743-750.

**Cerutti H** (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? Trends Genet 19: 39-46.

**Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y** (1997). Genetic Transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Phys 115: 971-980.

Chin HG, Choe MS, Lee SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ, Han CD (1999). Molecular analysis of rice plants haboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. Plant J 5: 615-623.

**Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol Biol 18: 675-689.

**Chuang CF, Meyerowitz EM** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4985-4990.

Church GM, Gilbert W (1984). Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1991-1995.

**Ciaffi M, Lafiandra D, Porceddu E, Benedettelli S** (1993). Storage-protein variation in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp *dicoccoides*) from Jordan and Turkey. I. Electrophoretic characterization of genotypes. Theor Appl Genet 86: 474-480.

**Ciaffi M, Dominici L, Lafiandra D** (1998). High molecular weight glutenin subunit variation in wild and cultivated einkorn wheats. Plant Syst Evol 209: 123-137.

**Ciclitira PJ** (2001). AGA Technical Review on Celiac Sprue. Gastroenterology 120: 1526-1540.

**Cole-Strauss A, Yonn K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB** (1996). Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA/DNA oligonucleotide. Science 273: 1386-1389.

**Crete P, Vaucheret H** (1999). Expression and sequence requirements for nitrite reductase co-suppression. Plant Mol Biol 41: 105-114.

Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. Nucleic Acids Res 31: 2705-2716.

**Dalmay T, Hamilton AJ, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC** (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not a virus. Cell 101: 543-553.

**Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM** (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Mol Plant Microbe Interact 7: 544-552.

**Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. Genes Dev 15: 188-200.

**Elmayan T and Vaucheret H** (1996). Single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. Plant J 9:787-797.

**English JJ, Baulcombe DC** (1997). The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependend virus resistance and gene silencing. Plant J 12: 1311-1318.

Feigherty C (1999). Coeliac disease. BMJ 319: 236-239.

**Fernandez-Calvin B, Orellana J** (1990). High molecular weight glutenin subunit variation in the *Sitopsis* section of *Aegilops*. Implications for the origin of the B genome of wheat. J Sci Food Agric 34: 370-377.

**Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM** (2003). Posttranscriptional gene silencing is not compromised in *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. Curr Biol 13: 236-240.

**Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-811.

**Forde BG, Heyworth A, Pywell J, Kreis M** (1985). Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. Nucleic Acids Res 13: 7327-7339.

**Franken P, Niesbach-Klösgen U, Weydemann U, Maréchal-Drouard L, Saedler H, Wienand U** (1991). The duplicated chalcone synthase genes *C*2 and *Whp (white pollen)* of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of *Whp* expression by the anthocyanin intensifying gene *in*. EMBO J 10: 2605-2612.

**Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW** (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins. Cereal Chem online.

**Gupta RB, Singh NK, Shepherd KW** (1989). The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on physical dough properties in progeny of two bread wheats. Theor Appl Genet 77: 57-64.

Halford NG, Field JM, Blair H, Urwin P, Moore K, Robert L, Thompson R, Flavell RB, Tatham AS, Shewry PR (1992). Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. Theor Appl Genet 83: 373-383.

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286: 950-952.

Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J 21: 4671-4679.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 404: 293-296.

Hammond-Kosack MC, Holdsworth MJ, Bevan MW (1993). *In vivo* footprinting of a low molecular weight glutenin gene (LMWG-D1) in wheat endosperm. EMBO J 12: 545-554.

Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.

Hannon GJ (2002). RNA interference. Nature 418: 244-251.

Harbert NP, Bartels D, Thompson RD (1985). Analysis of the gliadin multigene loci in bread wheat using nullisomic-tetrasomic lines. Mol Gen Genet 198: 234-242.

**Herrmann P** (2002). Isolierung und Expressionsanalyse einer Stärkesynthase V aus Weizen (*Triticum aestivum* L.) Universität Hamburg. Dissertation.

Heukeshoven J, Dernick R, Radola BJ (1986). Hrsg: In Eletrophorese-Forum '86: 22-27.

Hiwatashi Y, Nishiyama T, Fujita T, Hasebe M (2001). Establishment of gene-trap and enhancer-trap systems in the moss *Physcomitrella patens*. Plant J 28: 105-116.

**Hsia CC, Anderson OD** (2001). Isolation and characterization of wheat ω-gliadin genes. Theor Appl Genet 103: 37-44.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol 21: 635-637.

Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986). Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci USA 83: 8447-8451.

Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA (1996). Chalcone synthase cosupression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. Plant Mol Biol 31: 957-973.

Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanain A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature 421: 231-237.

Kasarda DD, Autran JC, Lew EJL, Nimmo CC, Shewry PR (1983). N-terminal amino acid sequences of  $\omega$ -gliadins and  $\omega$ -secalins: implications for the evolution of prolamin genes. Biochim Biophys Acta 747: 138-150.

**Kennerdell JR, Carthew RW** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled2* act in the Wingless pathway. Cell 95: 1017-1026.

**Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD** (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115: 209-216.

Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins F (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. Proc Natl Acad Sci USA 99: 11981-11986.

Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003). Transgene integration, organization and interactions in plants. Plant Mol Biol 52: 247-258.

Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK (1995). Cytoplasmatic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. Proc Natl Acad Sci USA 92: 1679-1683.

Kusaba M, Miyahara K, Iida S, Fukuoka H, Takano T, Sassa H, Nishimura M, Nishio T (2003). *Low glutelin content1*: A dominant mutation that suppresses the *glutelin* multigene family via RNA silencing in rice. Plant Cell 15: 1455-1467.

**Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

**Lafiandra D, Kasarda DD, Morris R** (1984). Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin protein components of the cultivars 'Cheyenne' and 'Chinese spring' by two-dimensional (two-pH) electrophoresis. Theor Appl Genet 68: 531-539.

**Lagudah ES, Halloran GM** (1988). Phylogenetic relationships of *Triticum tauschii* the D genome donor to hexaploid wheat. 1. Variation in HMW subunits of glutenin and gliadins. Theor Appl Genet 75: 592-598.

**Lawrence GJ, Shepherd KW** (1980). Variation in glutenin protein subunits of wheat. Aust J Biol Sci 33: 221-233.

**Lawrence RJ, Pikaard CS** (2003). Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. Plant J 36: 114-121.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell 75: 843-854.

Levin JZ, de Framond AJ, Tuttle A, Bauer MW, Heifetz PB (2000). Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis. Plant Mol Biol 44: 759-775.

**Lew EJL, Kuzmicky DD, Kasarda DD** (1992). Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. Cereal Chem 69: 508-515.

Liu Q, Singh SP, Green AG (2002). High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. Plant Phys 129: 1732-1743.

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002a). Endogenous and silencingassociated small RNAs in plants. Plant Cell 14: 1605-1619.

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002b). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. Science 297: 2053-2056.

Maes T, De Keukeleire P, Gerats T (1999). Plant tagnology. Trends Plant Sci 4: 90-96.

Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. Proc Natl Acad Sci USA 99: 15228-15233.

**Martienssen RA** (1999). Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2021-2026.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhmann R, Tuschl T (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell 110: 563-574.

**Maruta Y, Ueki J, Saito H, Nitta N, Imaseki H** (2001). Transgenic rice with reduced glutelin content by transformation with glutelin A antisense gene. Mol Breed 8: 273-284

Masci S, Lew EJL, Lafiandra D, Porceddu E, Kasarda DD (1995). Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits in durum wheat by reversed-phase high-performance liquid chromatography and N-terminal sequencing. Cereal Chem 72: 100-104.

Masci S, D'Ovidio R, Scossa F, Patacchini C, Lafiandra D, Anderson OD, Blechl AE (2003). Production and characterization of a transgenic bread wheat line over-expressing a low-molecular-weight glutenin subunit gene. Mol Breed 12: 209-222.

Matveeva OV, Mathews DH, Tsodikov AD, Shabalina SA, Gesteland RF, Atkins JF, Freier SM (2003). Thermodynamic criteria for high hit rate antisense oligonucleotide design. Nucleic Acids Res 31: 4989-4994.

Matzke M, Matzke AJM, Kooter JM (2001). RNA: Guiding Gene Silencing. Science 293: 1080-1083.

**Metzlaff M** (2002). RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. Biol Chem 383: 1483-1489.

**Meyer P, Saedler H** (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 23-48.

Mol JNM, Van Blokland R, De Lange P, Stam M, Kooter JM (1994). Posttranscriptional inhibition of gene expression: Sense and anti-sense genes. In: Paszkowski J. Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 309-334.

Molberg Ø, Solheim Flæte N, Jensen T, Lundin KEA, Arentz-Hansen H, Anderson OD, Uhlen AK, Sollid LM (2003). Intestinal T-cell responses to High-Molecular-Weight glutenins in celiac disease. Gastroenterology 125: 337-344.

Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Rémoué K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. Cell 101: 533-542.

**Müller M, Knudsen S** (1993). The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and the endosperm box. Plant J 4: 343-355.

Müller S, Wieser H (1995). Disulphide bonds of α-type gliadins. J Cereal Sci 22: 21-27.

Müller S, Wieser H (1997). The location of disulphide bonds in monomeric  $\gamma$ -gliadins. J Cereal Sci 26: 169-176.

**Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen RA (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-supression of homologous genes in *trans*. Plant Cell 2: 279-289.

Nehra NS, Chibbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. Plant J 5: 285-297.

**Nevo E, Payne PI** (1987). Wheat storage proteins: Diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel. Theor Appl Genet 74: 827-836.

Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci 95: 14687-14692.

**Nykänen A, Haley B, Zamore PD** (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107: 309-321.

**Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H** (2003). Producing decaffeinated coffee plants. Nature 423: 823.

**Pallotta MA, Graham RD, Langridge P, Sparrow DHB, Barker SJ** (2000). RFLP mapping of manganese efficiency in barley. Theor Appl Genet 101: 1100-1108.

**Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. Curr Biol 12: 1484-1495.

**Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vauchert H** (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. EMBO J 16: 4738-4745.

**Payne PI, Law CN, Mudd EE** (1980). Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of the wheat endosperm. Theor Appl Genet 58: 153-159.

**Payne PI, Corfield KG, Blackman JA** (1981). Correlation between the inheritance of certain high-molecular-weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J Sci Food Agric 32: 51-60.

**Payne PI, Holt LM, Lawrence GJ, Law CN** (1982). The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. Qual Plant Food Hum Nutr 31: 229-241.

**Payne PI, Lawrence GJ** (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-C1*, which code for the high-molecular-weight subunits of gluteinin in hexaploid wheat. Cereal Res Commun 11: 29-35.

**Payne PI, Holt LM, Jackson EA, Law CN** (1984). Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulations by plant breeding. Philos Trans R Soc Lond B 304: 359-371.

**Payne PI, Nightingale MA, Krattiger AF, Holt LM** (1987). The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of british-grown wheat varieties. J Sci Food Agric 40: 51-65.

**Payne PI** (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. Ann Rev Plant Physiol 38: 141-153.

Pusch O, Boden D, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B (2003). Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNAs. Nucleic Acids Res 31: 6444-6449.

**Que Q, Wanh HY, English JJ, Jorgensen R** (1997). The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. Plant Cell 9: 1357-1368.

**Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ** (2000). Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 97: 5363-5368.

**Reeves CD, Okita TW** (1987). Analyses of  $\alpha/\beta$ -gliadin genes from diploid and hexaploid wheats. Gene 52: 257-266.

**Renz-Polster H, Braun J** (2001). Basislehrbuch Innere Medizin 2. Auflage. Urban&Fischer, München und Jena.

**Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP** (2002). Prediction of plant microRNA targets. Cell 110: 513-520.

**Sabelli PA, Shewry PR** (1991). Chracterization and organization of the gene families at the *Gli-1* loci of bread and durum wheats by restriction fragment analysis. Theor Appl Genet 83: 209-216.

Sambrook J, Russel DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.

Schaefer DG (2001). Gene targeting in *Physcomitrella patens*. Curr Opin Plant Biol 4: 143-150.

**Schaefer DG, Zryd JP** (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Plant J 11: 1195-1206.

Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K (2002). The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. Proc Natl Acad Sci USA 99: 1064-1069.

Schuppan D, Hahn EG (2002). Gluten and the gut – lessons for immune regulation. Science 297: 2218-2220.

Schuppan D, Esslinger B (2003). Einheimische Sprue (Zöliakie) – Diagnostik, assoziierte Erkrankungen und Therapie. Dtsch Med Wochenschr 128: S69-S71.

Schwarz DS, Hutvanger G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 115: 199-208.

Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. Plant J 24: 895-903.

Seilmeier W, Valdez I, Mendez E, Wieser H (2001). Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species: II. Characterization of ω-gliadins. Eur Food Res Technol 212: 355-363.

Sharp AP (1999). RNAi and double-strand RNA. Genes Dev 13: 139-141.

Sharp AP (2001). RNA interference-2001. Genes Dev 15: 485-490.

**Shewry PR, Miflin BJ, Lew EJL, Kasarda DD** (1983). The preparation and characterization of an aggregated gliadin fraction from wheat. J Exp Bot 34: 1403-1410.

**Shewry PR, Tatham AS** (1990). The prolamine storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochem J 267: 1-12.

Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1992). The high molecular weight subunits of wheat glutenin. J Cereal Sci 15: 105-120.

Shewry PR, Napier JA and Tatham AS (1995). Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. Plant Cell 7: 945-956.

**Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS** (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Phil Trans R Soc Lond B 357: 133-142.

**Shewry PR, Halford NG** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. J Exp Bot 53: 947-958.

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. Cell 107: 465-476.

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407: 319-320.

**Sollid LM** (1998). Genetics of the immune response to gluten in coeliac disease. Dis Dig 16: 345-347.

**Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517.

**Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA, Green AG** (2002). HpRNA-mediated targetiong of the Arabidopsis *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. Plant Phys 129: 1723-1731.

Szittya G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. EMBO J 22: 633-640.

**Takumi S** (1996). Hygromycin-resistant calli generated by activation and excision of maize Ac/Ds transposable elements in diploid and hexaploid wheat cultured cell lines. Genome 39: 1169-1175.

**Takumi S, Murai K, Mori N, Nakamura C** (1999). Variations in the maize Ac transposase transcript level and the Ds excision frequency in transgenic wheat callus lines. Genome 42: 1234-1241.

**Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes Dev 17: 49-63.

**Tatham AS and Shewry PR** (1995). The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. J Cereal Sci 22: 1-16.

**Teerawanichpan P, Chandrasekharan MB, Jiang Y, Narangajavana J, Hall TC** (2003). Characterization of two DNA methyltransferase genes and RNAi-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus. Planta online.

Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN Stuitje AR (1990). Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limeted number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2: 291-299.

**Van Houdt H, Bleys A, Depicker A** (2003). RNA target sequences promote spreading of RNA Silencing. Plant Phys 131: 245-253.

**Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM** (2003). Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 100: 9632-9636.

Vasil V, Srivastava V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1993). Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured embryos. BioTechnology 11: 1553-1558.

**Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC** (1998). Systemic spread of sequencespecific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promotorless DNA. Cell 95: 177-187.

Waines JG, Payne PI (1987). Electrophoretic analysis of the high-molecular weight glutenin subunits of *T. monococcum*, *T. uratu*, and the A genome of bread wheat (*T. aestivum*). Theor Appl Genet 74: 71-76.

**Wang E, Wagner GJ** (2003). Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. Planta 216: 686-691.

**Wang MB, Waterhouse PM** (2002). Application of gene silencing in plants. Curr Opin Plant Biol 5: 146-150.

Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994). RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. Cell 76: 567-576.

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959-13964.

Waterhouse PM, Wang MB, Finnegan EJ (2001). Role of short RNAs in gene silencing. Trends Plant Sci 6: 297-301.

Weeks JT, Anderson OD, Blechl AE (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). Plant Phys 102: 1077-1084.

Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Greene AG, Waterhouse PM (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J 27: 581-590.

Wieser H, Antes S, Seilmeier W (1998). Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. Cereal Chem 75: 644-650.

Williams MDHM, Pena RJ, Mujeeb-Kazi A (1993). Seed protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*). Theor Appl Genet 87: 257-263.

Xiao H, Wang Y, Liu D, Wang W, Li X, Zhao X, Xu J, Zhai W, Zhu L (2003). Functional analysis of the rice AP3 homologue *OsMADS16* by RNA interference. Plant Mol Biol 52: 957-966.

**Yu H, Xu Y, Tan EL, Kumar PP** (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. Proc Natl Acad Sci USA 99: 16336-16341.

**Yonn K, Cole-Strauss A, Kmiec EB** (1996). Target gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2071-2076.

**Yu H, Kumar PP** (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. Plant Cell Rep 22: 167-174.

**Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA al 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101: 25-33.

**Zentella R, Yamauchi D, Ho THD** (2002). Molecular dissection of the Gibberellin/Abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. Plant Cell 14: 2289-2301.

**Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St Clair G, Baszczynski CL, Bowen B** (1999). Targeted manipulation of maize genes *in vivo* using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 96: 8768-8773.

**Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL** (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Nat Biotechnol 18: 555-558.

### **Danke!**

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg in der Abteilung für Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen (AMP II) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden vom BMB+F und Monsanto Agrar Deutschland GmbH gefördert.

Ich danke allen, die mich während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben!

Mein ausdrücklicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Horst Lörz für seine Unterstützung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für seine Bereitschaft meine Doktorarbeit als Gutachter zu bewerten.

Herrn Dr. Dirk Becker, der mir als direkter Ansprechpartner immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Herrn Dr. Herbert Wieser für die Durchführung der RP-HPLC-Analysen meiner Pflanzen.

Frau Petra Knies für ihre Ausdauer bei der Herstellung, Pflege und Analyse der vielen, vielen Pflanzen.

Frau Simone Amati, Herrn Dr. Manfred Gahrtz, Frau Sandra Kerbach, Frau Dr. Stefanie Lütticke, Frau Dr. Johanna Mönch, Herrn Dr. Stefan Scholten, Frau Maren Schröder, Frau Marlis Nissen und Frau Uschi Reinitz für Anregungen und Ideen im Laboralltag und für die großen und kleinen Gefallen, die das Leben leichter machen.

Last but not least meiner Mutter, Britta Folck, Dr. Maram Girgi, Oliver Bader und Martin Tamcke für ...... ihr wisst schon wofür!

# Lebenslauf

#### Persönliche Angaben

Name	Anne-Christine Folck
Geboren am	30.06.1971 in Hamburg
Familienstand	ledig

### Schulische Ausbildung

1977-1981	Grundschule Goosacker, Hamburg
1981-1990	Gymnasium Osdorf, Hamburg

### Berufsausbildung

1990-1991	Au-pair in New York, USA
1991-1994	Ausbildung nach dem Hamburger Modell zur Betriebswirtin (WAH) an
	der Wirtschaftsakademie Hamburg und zur Speditionskauffrau bei der
	HOYER GmbH, Internationale Fachspedition

#### Universitäre Ausbildung

1994-2000	Studium Biochemie/ Molekularbiologie, Universität Hamburg,
	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Lörz, AMP II,
	Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg,
	Thema: "Untersuchungen zur zellulären Lokalisation eines Enzyms des
	Stärkestoffwechsels in Weizen (Triticum aestivum L.)"

 seit 2000 Doktorarbeit "Posttranskriptionale Geninaktivierung der α-Gliadine in Weizen (*Triticum aestivum* L.)" im Rahmen eines BMB+F Forschungsprojektes in Kooperation mit Monsanto Agrar Deutschland GmbH Betreuung: Prof. Dr. H. Lörz, Arbeitsbereich AMP II, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg

Hamburg, Dezember 2003