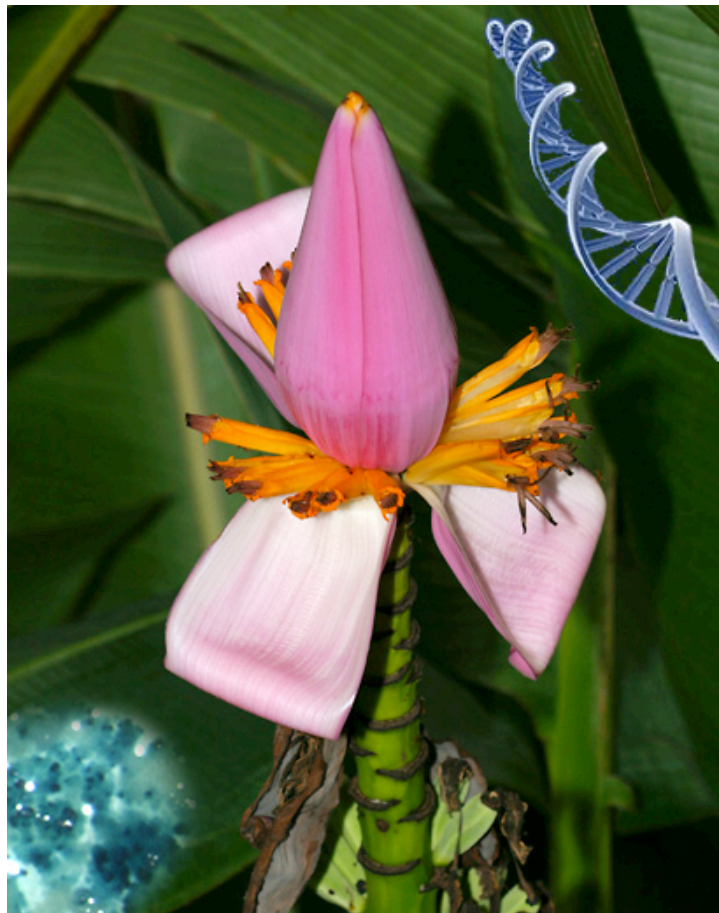




Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Optimalisatie van transgenexpressie in banaan (*Musa spp.*) via 'matrix attachment regions' (MARs)



Promotor:
Prof. Dr. Ir. B. Cammue
Departement Microbiële en Moleculaire Systemen

Co-promotor:
Prof. Dr. Ir. R. Swennen
Departement Biosystemen
Afdeling Plantenbiotechniek

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen:
cel- en gentechnologie

Patrizia Tavormina

September - 2011

“Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina.”



Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Optimalisatie van transgenexpressie in banaan (*Musa spp.*) via 'matrix attachment regions' (MARs)

Promotor:
Prof. Dr. Ir. B. Cammue
Departement Microbiële en Moleculaire Systemen

Co-promotor:
Prof. Dr. Ir. R. Swennen
Departement Biosystemen
Afdeling Plantenbiotechniek

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen:
cel- en gentechnologie

Patrizia Tavormina

September - 2011

Inhoudsopgave

<i>Inhoudsopgave</i>	<i>i</i>
<i>Woord vooraf</i>	<i>vi</i>
<i>Samenvatting</i>	<i>vii</i>
<i>Summary</i>	<i>viii</i>
<i>Lijst van afkortingen</i>	<i>ix</i>
<i>Lijst van tabellen</i>	<i>xii</i>
<i>Lijst van figuren</i>	<i>xiv</i>
<i>Inleiding</i>	<i>xvi</i>
1. Literatuurstudie	1
1.1 Inleiding	1
1.2 Variatie van transgenexpressie in planten	2
<i>1.2.1 Genetisch niveau</i>	<i>2</i>
1.2.1.1 Transcriptie	2
1.2.1.2 Translatie	2
<i>1.2.2 Epigenetisch niveau</i>	<i>3</i>
1.2.2.1 Positie-effecten	3
1.2.2.2 Neerwaartse genregulatie	4
1.3 Optimalisatie van transgenexpressie in planten	6
<i>1.3.1 Benaderingen om transgenexpressie te optimaliseren</i>	<i>6</i>
1.3.1.1 Hogere expressie ‘op maat’	6
Transcriptie	6
Translatie	8
1.3.1.2 Positie-effecten verhinderen	8
Matrix Attachment Regions (MARs)	9
Homologe recombinatie	9
Plaats-specifieke integratie	10
Plastidetransformatie	11
1.3.1.3 Neerwaartse genregulatie reduceren	11
Kopij-aantal verlagen	11
Virale suppressors	12
Mutanten voor PTGS	12

1.3.2 Focus 1: Matrix Attachment Regions (MARs)	12
1.3.2.1 Inleiding: definitie, eigenschappen en detectie	12
1.3.2.2 Functies en hypothetische werkingsmodellen	14
1.3.2.3 Effecten en toepassingen	16
Interpretatie Tabel 1	20
Aanvullingen bij Tabel 1	22
Toepassingen	24
1.3.2.4 MARs versus neerwaartse genregulatie	25
1.3.3 Focus 2: RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6 (RDR6)	27
1.3.3.1 Inleiding en eigenschappen	27
1.3.3.2 Rol in PTGS-reactiewegen en natuurlijke functie	28
'Inverted Repeat' (IR)-PTGS versus 'Sense' (S)-PTGS	29
Transitiviteit	31
'Trans-acting' (ta)-siRNA versus 'cis-natural antisense transcript' (nat)-siRNA	32
1.4 Algemene en specifieke doelstelling van deze thesis	33
2. Materialen en methoden	34
2.1 Aanmaak van vectoren	34
2.1.1 Antibioticum stockoplossingen en media	34
2.1.2 DNA-manipulaties in <i>E. coli</i> en <i>A. tumefaciens</i>	35
2.1.2.1 Plasmide-isolatie	35
2.1.2.2 Bepaling van DNA-concentratie en zuiverheid	35
2.1.2.3 Restrictiedigest	36
2.1.2.4 Partiële restrictiedigest	37
2.1.2.5 Plasmide-PCR	38
2.1.2.6 Agarosegelelektroforese	40
2.1.2.7 DNA-opzuivering uit agarosegel	41
2.1.2.8 Defosforylatie	41
2.1.2.9 Ligatie	41
2.1.2.10 TOPO TA-klonering	42
2.1.2.11 Transformatie van chemisch competente cellen	42
2.1.2.12 Kolonie-PCR	43
2.1.2.13 DNA-sequentiebepaling en <i>in silico</i> analyse	44
2.1.2.14 Glycerolstocks	46
2.1.2.15 Overzicht gebruikte en aangemaakte vectoren	46

2.2 Aanmaak van transgene bananenculturen	47
2.2.1 <i>Embryogene celsuspensies en cultuurcondities</i>	47
2.2.2 <i>Plantmanipulaties in Musa spp.</i>	48
2.2.2.1 Banaantransformatie gemedieerd door <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.2.2.2 Selectie van transgene celkolonies	49
2.3 Analyse van de GUS-activiteit	50
2.3.1 <i>Kwalitatieve histochemische kleuring</i>	50
2.3.2 <i>Kwantitatieve enzymatische test</i>	50
2.3.2.1 Eiwitextractie	50
2.3.2.2 MUG-test	50
2.4 Statistische analyse	50
2.4.1 <i>Parametrische test: 'one-way' ANOVA</i>	50
2.4.1.1 Shapiro-Wilk's test en Levene's test	51
2.4.1.2 Tukey's test/ Unequal HSD test en Duncan's test	51
2.4.2 <i>Niet-parametrische testen</i>	51
2.4.2.1 Kruskal-Wallis	52
2.4.2.2 Mann-Whitney's test	52
2.4.3 <i>Sterktes en zwaktes van gebruikte statistische testen</i>	52
2.4.4 <i>Coëfficiënt van de variantie</i>	53
3. Resultaten en bespreking	54
3.1 Aanmaak van vectoren voor geoptimaliseerde transgenexpressie in <i>Musa spp.</i>	54
3.1.1 <i>Doelstelling voor de MARs-vector</i>	54
3.1.2 <i>Kloneringsstrategie en resultaten voor de MARs-(controle)vector</i>	54
3.1.2.1 VpPZP200ML-pFAJ3411 (intermediaire MARs-controlevector) en VpFAJ3223-pFAJ3411 (intermediaire MARs-vector)	55
Kolonie-PCR	55
Restrictiedigest	56
3.1.2.2 VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A= pCMPG7387 (MARs-controlevector zonder intron) en VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A= pCMPG7388 (MARs-vector zonder intron)	56
Kolonie-PCR	57
Restrictiedigest	57
Sequentiebepaling	59

3.1.2.3	VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19= pCMPG7404 (finale MARs-vector met intron) en VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19= pCMPG7403 (finale MARs-controlevector met intron)	61
	Kolonie-PCR	62
	Restrictiedigest	63
	Sequentiebepaling	64
3.1.3	Discussie	65
3.1.3.1	Sucesvolle aanmaak van de finale MARs-(controle)-vector	65
3.1.3.2	Kwaliteit van de bekomen vectorconstructen	66
3.1.4	Doelstelling voor de MARs-vector met <i>rdr6</i>-‘hairpin’	67
3.1.5	Kloneringsstrategie en resultaten voor de MARs-vector met <i>rdr6</i>-‘hairpin’	67
3.1.5.1	VpFAJ3552-VpFAJ3142 = pCMPG7389	68
	Kolonie-PCR	68
	Restrictiedigest	69
	Sequentiebepaling	69
3.1.5.2	<i>rdr6</i> -‘hairpin’	70
3.1.5.3	‘Hairpin’-pCMPG7404 en ‘hairpin’-pCMPG7403	71
3.1.6	Discussie	72
3.1.6.1	Sucesvolle aanmaak van een intermediaire ‘hairpin’-vector	72
3.1.6.2	Werkingsmechanisme: neerwaartse regulatie van <i>rdr6</i> via ‘hairpin’	72
3.1.6.3	Kwaliteit van het gebruikte <i>rdr6</i> -‘hairpin’-construct	73
3.2	Analyse van de GUS-activiteit in <i>Musa spp.</i>	74
3.2.1	Doelstelling en experimenteel ontwerp: experiment 1 (pCMPG7387 en pCMPG7388)	74
3.2.2	Resultaten: experiment 1	76
3.2.2.1	Kwalitatief: histochemische kleuring	76
3.2.2.2	Kwantitatief: GUS-activiteit	78
	Transiënte fase	78
	Stabiele fase	80
3.2.3	Doelstelling en experimenteel ontwerp: experiment 2 (pCMPG7403 en pCMPG7404)	82
3.2.4	Resultaten: experiment 2	83
3.2.4.1	Kwalitatief: histochemische kleuring	83
3.2.4.2	Kwantitatief: GUS-activiteit	84
	Transiënte fase	84
	Stabiele fase	86

3.2.5 <i>Discussie</i>	88
3.2.5.1 Succesvolle transformatie van embryogene celsuspensies van <i>Musa spp.</i>	88
3.2.5.2 Transiënte fase: in de MAR-populatie werd het niveau van transgenexpressie verhoogd, maar de variabiliteit niet verlaagd	89
3.2.5.3 Stabiele fase: in de MAR-populatie werd het niveau van transgenexpressie niet verhoogd en de variabiliteit licht verlaagd	90
3.2.5.4 Kwaliteit van de proefopzet	91
3.2.5.5 Kwaliteit van de gebruikte tabMARs	92
3.2.5.6 Een blik op experimentele gegevens uit de literatuur	94
4. Algemene bespreking en besluit	95
4.1 Hypothesen	95
4.2 Een verhelderende kijk op de resultaten?	96
4.2.1 <i>Transiënte fase: tabMARs verhogen het niveau van transgenexpressie in celclusters van Musa spp. als ‘enhancer’</i>	96
4.2.2 <i>Stabiele fase: kunnen tabMARs de variabiliteit van transgenexpressie in celkolonies van Musa spp. reduceren?</i>	97
4.3 Toekomstig onderzoek omtrent de optimalisatie van transgenexpressie in <i>Musa spp.</i>	98
4.4 Het potentieel van MARs in <i>Musa spp.</i>	98
4.5 Besluit	99
<i>Referentielijst</i>	103
<i>Bijlage I</i>	117

Woord vooraf

Ik wil een groot woord van dank richten aan mijn promotor Bruno Cammue en co-promotor Rony Swennen om deel uit te mogen maken van een samenwerkingsverband tussen twee labo's met hun unieke eigenheid en internationale, wetenschappelijke uitstraling. Dank u aan alle personen verbonden aan het CMPG-PFI en Laboratorium voor Tropische Plantenteelt om naast hopen wetenschappelijke kennis en ervaring, ook mijn mensenkennis te vergroten. Hierbij vermeld ik in het bijzonder mijn begeleiders Barbara en Serge, omdat ik jullie complementaire visie en steun sterk apprecieer. Ook wil ik al mijn vrienden uit 2^o master bio-ingenieurswetenschappen bedanken voor alle tips, babbeltjes, uitstapjes en de goede hulp en samenwerking doorheen vijf boeiende jaren!

Een speciale dank wil ik richten aan mijn ouders en zussen. Dank u wel voor het zijn van de MARS in mijn leven. Jullie zijn alvast meervoudig erin geslaagd mijn expressie te verhogen!!! Het afsluiten van deze thesis betekent voor mij in de eerste plaats het begin van een nieuw hoofdstuk met een verrijkte bagage op de rug. Jullie hebben mij onvoorwaardelijk gesteund en ik kan 24 op 7 op jullie rekenen. Nu wordt het tijd dat ik eens meer voor jullie ga doen! :-))

Geniet van het lezen! En neem niet alles te serieus...



Samenvatting

De planttransformatietechnologie vormt de basis voor de ontwikkeling van genetisch gemodificeerde gewassen die veelvuldig gebruikt worden in het onderzoek en voor commercialisatie. Deze technologie wordt echter beperkt door een onvoorspelbaar en soms laag niveau van transgenexpressie. Hierdoor moeten analyses op grote schaal worden uitgevoerd, maar deze benadering is arbeidsintensief, tijdrovend en duur. Het verkrijgen van een voorspelbare transgenexpressie is dus een belangrijke uitdaging voor de planttransformatietechnologie. De hoofddoelstelling van deze thesis is de optimalisatie van transgenexpressie in banaan (*Musa spp.*). Volgende specifieke doelen worden beoogd:

- (i) de verhoging van het niveau van transgenexpressie,
- (ii) de reductie van de variabiliteit van transgenexpressie tussen transgene lijnen.

Ten eerste werden ‘**matrix attachment regions**’ (MARs) gehanteerd uit *Nicotiana tabacum* (tabMARs). MAR-elementen zijn eukaryote, onvertaalde DNA-sequenties van 300 tot 5000 bp lang die de unieke eigenschap vertonen hun DNA-strengen te ontdebellen onder bepaalde condities. MARs kunnen neerwaartse genregulatie of ‘silencing’ verhinderen. Geschikte vectoren waarin deze MARs het *gusA(-intron)* reporter gen en *neo* selectiemerker gen flankeren werden succesvol aangemaakt voor *Musa* transformatie.

- Het **niveau** van transgenexpressie werd niet verhoogd in MAR-transformanten. Een mogelijke verklaring is dat de gebruikte tabMARs geen sterke bindingsaffiniteit hebben met de nucleaire matrix van *Musa spp.* Een andere verklaring is dat de tabMARs het niveau van transgenexpressie zodanig verhoogden dat er toch neerwaartse genregulatie optrad.

- De **variabiliteit** van transgenexpressie werd niet gereduceerd, net als in talrijke andere experimenten vermeld in de literatuur. Er moet opgemerkt worden dat deze resultaten werden bekomen in niet gedifferentieerde cellen van *Musa spp.* en zij kunnen niet geëxtrapoleerd worden naar het plantniveau. Verder onderzoek zal dus moeten uitwijzen of tabMARs beloftevol zijn voor de optimalisatie van transgenexpressie in *Musa spp.*

Ten tweede werd het kloneringswerk grotendeels uitgevoerd om in *Musa spp.* het gen uit te schakelen dat codeert voor het **RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6 (RDR6)**. Dit enzym heeft een sleutelrol in allerlei reactiewegen van post-transcriptionele ‘silencing’. ‘Silencing’ wordt steeds meer genoemd als de hoofdoorzaak van variatie in transgenexpressie bij planten en dit mechanisme kan deels onderdrukt worden aan de hand van deze benadering. Door MARs te introduceren in RDR6 neerwaarts gereguleerde mutanten wordt de transgenexpressie nog beter geoptimaliseerd.

Summary

Plant transformation is the basis for the development of genetically modified crops which are frequently used in research and for commercialization. However, this technology is hampered by an unpredictable and sometimes low level of transgene expression. Hence, large scale analyses are required, but these are labor intensive, time consuming and expensive. Obtaining a predictable transgene expression is a major challenge for plant transformation. Optimization of transgene expression in banana (*Musa spp.*) was the primary goal of this thesis. More specifically, the following objectives were aimed at:

- (i) to increase the level of transgene expression,
- (ii) to reduce the variability of transgene expression between transgenic lines.

Firstly, '**matrix attachment regions**' (**MARs**) of *Nicotiana tabacum* (tabMARs) were used. MAR elements are eukaryotic, untranslated DNA sequences of 300 to 5000 bp, which exhibit the unique property to unwind their DNA strands under certain conditions. MARs can prevent silencing. Suitable vectors in which the *gusA(-intron)* reporter gene and *neo* selectable marker gene are flanked by MARs were successfully constructed for banana transformation.

- The **level** of transgene expression was not increased in MARs transformants. A possible explanation is that the used tabMARs had no strong binding affinity to the nuclear matrix of *Musa spp.* Another explanation is that the level of transgene expression by tabMARs increased such that silencing did occur.

- The **variability** of transgene expression was not reduced, confirming numerous other experiments reported in literature. These results were obtained in undifferentiated cells of *Musa spp.* and cannot be extrapolated to the plant level. Further research will show whether tabMARs are promising for the optimization of transgene expression in *Musa spp.*

Secondly, the cloning was largely performed to downregulate in banana the gene encoding the **RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6)**. This enzyme plays a key role in various pathways of post-transcriptional 'silencing'. Silencing is increasingly cited as the main cause of variation in transgene expression in plants and this mechanism can be partially disabled by this approach. The transgene expression could be optimized even better by introducing MARs in RDR6 silenced mutants.

Lijst van afkortingen

AGO	Argonaute eiwit
ANOVA	'ANalysis Of VAriance'
Ap(R)	gen coderend voor ampicillineresistentie
bp	basenparen
CMPG-PFI	Centrum voor Microbiële en Plantengenetica-Plant Fungi Interacties
CV	coëfficiënt van de variantie
DCL	Dicer-like enzym
DNA	deoxyribonucleïnezuur
ds	dubbelstrengig
EDTA	EthyleenDiamineTetra-Azijnzuur
g	valversnelling
G(R)	gen coderend voor geneticineresistentie
<i>gfp</i>	'green fluorescent protein'
GUS	β -glucuronidase eiwit
<i>gusA</i>	gen coderend voor β -glucuronidase uit <i>E. coli</i>
H(R)	gen coderend voor hygromycineresistentie
HDGS	homology dependent gene silencing'
HEN1	HUA 'enhancer' 1
IR-PTGS	'inverted repeat' - post-transcriptionele 'silencing'
Km(R)	gen coderende voor kanamycineresistentie
LB	linkergrenssequentie
LB	'Luria-Bertani' of 'L-Broth'
<i>luc</i>	gen coderend voor luciferase
MARs	'matrix attachment regions'
med	mediaan
min	minuten
miRNA	microRNA
MS	Murashige en Skoog
MU	methylumbelliferone
MUG	4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide
n	grootte van de steekproef
nat-siRNA	'cis-natural antisense transcript'-siRNA
NEB	New England Biolabs

<i>neo</i>	gen coderend voor geneticineresistentie
nt	nucleotide
OD	optische dichtheid
p35S	35S-promotor van het 'cauliflower mosaic virus'
pCAS	promotor van het 'cassava vein mosaic virus'
PCR	'polymerase chain reaction'
pCSVMV	promotor van het 'cassava vein mosaic virus'
<i>enh35S</i>	enhanced' 35S-promotor van het 'cauliflower mosaic virus'
pNOS	nopalinesynthase promotor van <i>A. tumefaciens</i>
PTGS	post-transcriptionele 'silencing'
pUBI	ubiquitinepromotor uit <i>Z. Mays</i>
ra-siRNA	'repeat associated'-siRNA
RB	rechtergrenssequentie
rDNA	ribosomaal DNA
RDR6	RNA-afhankelijk RNA polymerase 6
<i>rdr6</i>	gen coderend voor RDR6
resp.	respectievelijk
RISC	'RNA -induced silencing complex'
RNAi	'RNA interference'
rpm	'revolutions per minute'
s	standaardafwijking
s ²	variantie
SDE3	'silencing defective 3'
<i>sgs</i>	'suppressor of gene silencing'
SIDD	'stress-induced DNA duplex destabilization'
siRNA	'small interfering' RNA
Sm(R)/Sp(R)	gen coderend voor spectinomycine-/streptomycineresistentie
S-PTGS	'sense' - post-transcriptionele 'silencing'
sRNA	'small' RNA
ss	enkelstrengig
T	timentin
tabMAR	'matrix attachment region' uit tabak <i>N. Tabacum</i>
ta-siRNA	'trans-acting' siRNA
TGS	transcriptionele 'silencing'
<i>tMAS</i>	mannopinesynthase terminator uit <i>A. tumefaciens</i>

TMV	'tobacco mosaic virus'
tNOS	nopalinesynthase terminator uit <i>A. tumefaciens</i>
tOCS	octopinesynthase terminator uit <i>A. tumefaciens</i>
u	uur
U	'units'
UTR	'untranslated region'
VIGS	'virus-induced gene silencing'
vs.	versus
WEX	'Werner exonuclease'
YEP	'Yeast Extract Peptone'
YM	'Yeast extract-Malt extract'

Lijst van tabellen

Tabel 1 De effecten van flankerende MARs op het expressieniveau en de variabiliteit van expressie van een transgen in verschillende plantensoorten. _____	17
Tabel 2 Antibioticum stockoplossingen voor <i>E. coli</i> en <i>A. tumefaciens</i> . _____	34
Tabel 3 Samenstelling van LB-medium voor het opgroeien van bacteriekolonies van <i>E. coli</i> en <i>A. tumefaciens</i> en YEP-medium voor <i>A. tumefaciens</i> . _____	34
Tabel 4 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de 'restrictiedigest'. _____	36
Tabel 5 Overzicht van de gebruikte restrictie-enzymen in het kloneringswerk en de bijhorende reactiecondities. _____	37
Tabel 6 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de plasmide-PCR-reactie. _____	38
Tabel 7 Overzicht van de gebruikte primers voor plasmide-PCR. _____	39
Tabel 8 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de defosforylatiereactie. _____	41
Tabel 9 Verhoudingen van de componenten, naast insert en vector, in het reactiemengsel voor de ligatiereactie. _____	42
Tabel 10 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de kolonie-PCR-reactie. _____	43
Tabel 11 Overzicht van de gebruikte primers voor kolonie-PCR. _____	44
Tabel 12 Overzicht van de gebruikte primers voor sequentiebepaling van de bekomen vectoren. _____	45
Tabel 13 Overzicht van gebruikte primaire en intermediaire vectoren voor het kloneringswerk. _____	46
Tabel 14 Overzicht van de finale vectoren met en zonder tabMARs en positieve controlevectoren voor de banaantransformaties. _____	47
Tabel 15 Antibioticumstockoplossingen voor de selectie van transgeen plantenmateriaal en de afdoding van <i>A. tumefaciens</i> . _____	47
Tabel 16 Samenstelling van het YM- en ZZ-medium. _____	48
Tabel 17 Gebruik van statistische testen voor de detectie van significante verschillen voor het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie in datasets. _____	53
Tabel 18 Experiment 1, transiënte fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23. _____	80
Tabel 19 Experiment 1, stabiele fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23. _____	82
Tabel 20 Experimenteel ontwerp en werkplanning van experiment 2. _____	83

Tabel 21 Experiment 2, transiënte fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19. _____	86
Tabel 22 Experiment 2, stabiele fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19. _____	88
Tabel 23 Overzicht van de bekomen resultaten in fluorometrische testen voor experiment 1 en 2. _____	90

Lijst van figuren

Figuur 1 Homologe recombinatie gemedieerd door zink-vinger nucleasen (ZFN's).	9
Figuur 2 Algemeen principe van plaatsspecifieke integratie.	10
Figuur 3 Het 'stress-induced DNA duplex destabilization' (SIDD)-profiel van H9 MARs uit <i>N. tabacum</i> .	14
Figuur 4 Het 'carpet tack'-model verklaart hoe MARs als isolator van transgenen fungeert.	16
Figuur 5 MARs (A) verhinderen transcriptionele doorleesactiviteit en 'cis-silencing'.	25
Figuur 6 (A) De IR-PTGS reactieweg en (B) de S-PTGS reactieweg.	30
Figuur 7 Transitiviteit.	31
Figuur 8 Aanmaak intermediaire MARs-controlevector <i>VpPZP200ML-pFAJ3411</i> en intermediaire MARs-vector <i>VpFAJ3223-pFAJ3411</i> .	55
Figuur 9 Aanmaak finale MARs-controlevector <i>pCMPG7387</i> en MARs-vector <i>pCMPG7388</i> .	56
Figuur 10 'Restrictiedigest' met <i>AscI</i> om na te gaan of het bekomen construct voor <i>pCMPG7387</i> (A) en voor <i>pCMPG7388</i> (B) de cassette voor geneticineresistentie (<i>pNOS-neo-tNOS</i>) bevat.	57
Figuur 11 Extra 'restrictiedigest' met <i>HindIII</i> en <i>SacI</i> om de correctheid van het bekomen construct voor <i>pCMPG7387</i> in kolonie A12 te verifiëren.	58
Figuur 12 Extra 'restrictiedigest' met <i>SacI</i> en <i>SacII</i> om de correctheid van het bekomen construct voor <i>pCMPG7388</i> in kolonie J4 te verifiëren.	59
Figuur 13 Voorstelling van de finale MARs-controlevector zonder intron in <i>gusA</i> , <i>pCMPG7387</i> (A), en de finale MARs-vector zonder intron in <i>gusA</i> , <i>pCMPG7388</i> (B).	60
Figuur 14 Aanmaak finale MARs-controlevector <i>pCMPG7403</i> en MARs-vector <i>pCMPG7404</i> .	62
Figuur 15 'Restrictiedigest' met <i>SacI</i> om na te gaan of de bekomen constructen voor <i>pCMPG7403</i> en <i>7404 pUBI-gusA-intron</i> bevatten.	63
Figuur 16 Extra 'restrictiedigest' met <i>BamHI</i> om de correctheid van het bekomen construct voor <i>pCMPG7403</i> in kolonies P1, P2 en P3 te verifiëren, alsook het bekomen construct voor <i>pCMPG7404</i> in kolonie S1.	64
Figuur 17 Voorstelling van de finale MARs-controlevector met <i>gusA</i> -intron, <i>pCMPG7403</i> (A), en de finale MARs-vector met <i>gusA</i> -intron, <i>pCMPG7404</i> (B).	65
Figuur 18 Aanmaak intermediaire vector <i>VpFAJ3552-VpFAJ3142</i> of <i>pCMPG7389</i> .	68
Figuur 19 'Restrictiedigest' met <i>HindIII</i> en <i>NcoI</i> om na te gaan of het bekomen construct voor <i>pCMPG7389</i> de promotor <i>penh35S</i> bevat.	69
Figuur 20 Aanmaak van de intermediaire vector 'hairpin'- <i>pCMPG7389</i> .	71
Figuur 21 Voorstelling van de finale MARs/ <i>rdr6</i> -controlevector, 'hairpin'- <i>pCMPG7403</i> (A), en de finale MARs/ <i>rdr6</i> -vector, <i>pCMPG7404</i> (B).	71

Figuur 22 Experiment 1: transiënte gusA-expressie in embryogene suspensiecellen van de bananencultivar ‘Williams’: ongetransformeerd (A) en getransformeerd via <i>A. tumefaciens</i> met vector (B) pCMPG7388, (C) pCMPG7387 en (D) pLSKUL23. _____	76
Figuur 23 De twee typen contaminaties op ZZ-medium 12 weken na transformatie, nadat de mesh met de embryogene suspensiecellen weggehaald werd. _____	77
Figuur 24 Besmette stalen met <i>A. tumefaciens</i> twaalf weken na transformatie. _____	77
Figuur 25 Beschrijvende statistiek voor experiment 1, transiënte fase. _____	79
Figuur 26 Beschrijvende statistiek voor experiment 1, stabiele fase. _____	81
Figuur 27 Experiment 2: transiënte gusA-expressie in embryogene suspensiecellen van de bananencultivar ‘Williams’: (A) ongetransformeerd en getransformeerd via <i>A. tumefaciens</i> met vector (B) pCMPG7404, (C) pCMPG7403 en (D) pETKUL19. _____	84
Figuur 28 Beschrijvende statistiek voor experiment 2, transiënte fase. _____	85
Figuur 29 Beschrijvende statistiek voor experiment 2, stabiele fase. _____	87
Figuur 30 Het ‘stress-induced DNA duplex destabilization’ (SIDD)-profiel van tabMARs uit <i>N. tabacum</i> . _____	94

Inleiding

Van herbicidentolerante soja en insectenresistente maïs tot virusresistente papaya, van ‘gouden’ rijst tot planten als medicijnproducenten, het is een greep uit een rijtje planten die veel stof hebben doen opwaaien de laatste jaren. Al zijn deze planten sterk verschillend, toch hebben ze allemaal één eigenschap gemeen. Ze brengen één of meerdere genen tot expressie die nooit eerder in deze planten aanwezig waren. Men spreekt over ‘transgenexpressie’. In de jaren 80 legden Marc Van Montagu en Jozef Schell de basis voor de planttransformatietechnologie. Sindsdien kent dit genetisch manipuleren (‘genetic engineering’) van planten een bruisend bestaan in de onderzoekswereld en de laatste 15 jaar ook in de commerciële wereld. Deze techniek lijkt echter vaak onder een lage efficiëntie en de transgenexpressie varieert sterk tussen verschillende transformanten. Bijgevolg vragen deze nadelen om een grootschalige aanpak, zodat correcte conclusies getrokken worden uit de uitgevoerde onderzoeken. Deze aanpak verhoogt echter ook het kostenplaatje en is tijdrovend.

Het is duidelijk dat een nieuwe periode aanbreekt voor de planttransformatie waarin men streeft naar de ‘finetuning’ van deze transgenexpressie. Dankzij nieuwe inzichten in de genetica en epigenetica verbreden de inzichten op vlak van transgenexpressie. Al blijft het een complex verhaal om alle factoren die transgenexpressie beïnvloeden te identificeren en op te helderen op welke manier zij interfereren met elkaar. Deze vernieuwde kennisinzichten kunnen vervolgens gebruikt worden om effectief deze transgenexpressie te optimaliseren.

In deze thesis worden concreet getracht om de volgende vragen te beantwoorden: kan (i) het **niveau** van transgenexpressie verhoogd worden en (ii) de **variabiliteit** van transgenexpressie verlaagd worden in de cultivar ‘Williams’ uit de triploïde Cavendish groep (AAA) van *Musa* spp.? Deze doelstellingen worden aangepakt aan de hand van twee benaderingen.

Om te beginnen inspireert deze thesis zich op het samenspel tussen de nucleaire matrix en het chromatine om de transgenexpressie te verbeteren. Preciezer gesteld wordt het effect van ‘matrix attachment regions’ (MARs) bestudeerd in *Musa* spp. Ten tweede wordt geprobeerd om in de plant een intrinsiek verdedigingsmechanisme op DNA- en RNA-niveau te omzeilen. Preciezer gesteld wordt een mechanisme van ‘silencing’ of neerwaartse regulatie gedeeltelijk uitgeschakeld door gebruik te maken van een element uit dit mechanisme zelf, het RNA-afhankelijk RNA polymerase 6 (RDR6). De doelstelling is met andere woorden ‘*to silence silencing*’.

De optimalisatie van transgenexpressie in *Musa spp.* aan de hand van MARs en/of silencing van RDR6 biedt een brede waaier aan mogelijkheden en voordelen voor zowel onderzoeksdoeleinden, als economisch belangrijke doeleinden.

Het onderzoek dat in deze thesis ondernomen werd, wordt uitvoerig beschreven in de volgende hoofdstukken:

- *Hoofdstuk I:* in de literatuurstudie worden een handvol bronnen van variatie in transgenexpressie beschreven, net als benaderingen om meer stabiliteit te creëren. Vervolgens wordt dieper ingegaan op MARs en het RDR6.
- *Hoofdstuk II:* in het deel materialen & methoden wordt alle technische informatie uiteengezet voor het correct verzamelen van experimentele gegevens.
- *Hoofdstuk III:* de bekomen resultaten worden overzichtelijk samengezet en kritisch besproken, beginnend van het kloneringswerk tot de effecten van MARs in getransformeerde bananencellen.
- *Hoofdstuk IV:* afsluitend worden hypothesen vooropgesteld in verband met de verwachte effecten van MARs en RDR6 in *Musa spp.* De resultaten worden verhelderd, het vervolgonderzoek op deze thesis wordt beschreven en er wordt een blik geworpen op de toekomst in dit groeiend onderzoeksdomein, om af te ronden met een finaal besluit.

1. Literatuurstudie

1.1 Inleiding

Het construeren van transgene planten is niet meer weg te denken als onderzoeksmethode in het domein van de plantenbiotechnologie. Bovendien heeft het sinds 1996 ook zijn nut bewezen in het commerciële domein door het verbeteren van een groot aantal plantenkenmerken zoals ondermeer de resistentie tegen ziektes en de productiviteit van een gewas (James, 2009). Ondanks het groot aantal transgene planten dat gecreëerd werd, kampt de planttransformatietechnologie met een aantal praktische beperkingen waaronder een relatief lage transformatiefrequentie of een onvoorspelbare en een lage transgenexpressie in bepaalde transgene lijnen (Birch, 1997; Butaye *et al.*, 2005). Dit heeft als gevolg dat een transgene populatie veelal gekenmerkt wordt door een variatie van transgenexpressie tussen haar individuele transformanten (Peach en Velten, 1991). Ook kan de transgenexpressie in opeenvolgende plantengeneraties variëren of zelfs volledig verdwijnen (Scheid *et al.*, 1991). Deze variatie maakt het noodzakelijk transformaties en analyses van transgenen op grote schaal toe te passen om voldoende gewenste transformanten te bekomen en bekomen fenotypes correct te interpreteren (Birch, 1997). Deze grootschalige benadering is echter arbeidsintensief, tijdrovend en duur (Butaye *et al.*, 2005).

Een belangrijke uitdaging voor de planttransformatietechnologie is het verkrijgen van een voorspelbare transgenexpressie. Het minimaliseren van de inter-transformanten variatie van transgenexpressie zal het mogelijk maken dat meerdere transgene planten een gewenst en stabiel fenotype bekomen, ook doorheen verschillende generaties. Dit biedt duidelijk voordelen op zowel praktisch en technisch vlak, als op commercieel vlak (Butaye *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005). Om deze doelstelling te verwezenlijken werden reeds verschillende factoren geïdentificeerd die een variabele transgenexpressie veroorzaken en werden doelgericht methodes ontwikkeld om meer stabiliteit te verkrijgen in de transgenexpressie. In deze thesis wordt een selectie gemaakt uit het breed areaal aan factoren die variatie in transgenexpressie veroorzaken in planten op zowel genetisch als epigenetisch niveau (paragraaf 1.2). Zodoende wordt aan de hand van een aantal kernfactoren een beeld geschetst van de complexiteit van deze materie. Vervolgens wordt de focus gelegd op twee methoden om de variatie van transgenexpressie te minimaliseren in planten (paragraaf 1.3).

1.2 *Variatie van transgenexpressie in planten*

1.2.1 Genetisch niveau

Het genetisch niveau vormt het eerste niveau waarop factoren werden geïdentificeerd die variatie in transgenexpressie bij planten teweegbrengen. Het centrale dogma van de moleculaire biologie stelt dat de gedetailleerde (residu per residu) overdracht van sequentiële informatie gebeurt via DNA naar RNA en uiteindelijk naar het eiwit. Tijdens deze overdrachtsprocessen werden verschillende factoren geïdentificeerd die variatie in transgenexpressie veroorzaken.

1.2.1.1 *Transcriptie*

Ten eerste kan men een aantal factoren identificeren die een rol spelen ter hoogte van de transcriptie van het geïntegreerde transgen en op deze manier variatie in zijn expressie teweegbrengen: promotors en terminators. Promotors spelen een sleutelrol om een hoog niveau van transcriptie te bekomen. Zij bevatten namelijk bindingsplaatsen voor het RNA-polymerase en transcriptiefactoren die het transcriptieproces initiëren en reguleren. Een groot aantal promotors bewezen reeds hun nut in ontelbare toepassingen in de context van het onderzoek of de commerciële productie (Sharma en Sharma, 2009). Zij brachten allerhande biosynthetische componenten in hoge mate tot expressie, echter met variatie in het expressieniveau. Er wordt verwezen naar Kole (2010) voor een uitgebreide en overzichtelijke weergave van het effect van een groot aantal promotors op het niveau van transgenexpressie in planten. Zo verhoogt bijvoorbeeld de ‘super γ -zein’ promotor het totale carotenoïdengehalte 5 tot 34 keer in *Zea mays* (*Z. mays*) voor gebruik tegen vitamine A-deficiëntie (Aluru *et al.*, 2008). De invloed van terminators op de transgenexpressie werd veel minder bestudeerd (De Bolle *et al.*, 2003). Echter, recent wordt het effect van deze factor onderzocht in toepassingsgericht onderzoek (Valkov *et al.*, 2011; Beyene *et al.*, 2011). Zo verhoogt bijvoorbeeld de terminator *rrnB* (ribosomaal RNA) de accumulatie van het transcript van *psbA*, coderend voor het polypeptide D1 in fotosysteem II-complex, 3,7 tot 9,1 keer in *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) (Valkov *et al.*, 2011).

1.2.1.2 *Translatie*

Ten tweede kan men een aantal factoren identificeren die een rol spelen ter hoogte van de translatie van een transgen: het 5' UTR (untranslated region) en het codongebruik. De initiatie van translatie en de efficiëntie ervan wordt namelijk sterk bepaald door het 5' UTR en deze mechanismen zijn reeds grondig gekend (Sharma en Sharma, 2009). Dit wordt geïllustreerd in paragraaf 1.3.1.1. Ook

kan de efficiëntie van translatie beïnvloed worden door het codongebruik. Dit gebruik kan namelijk geoptimaliseerd worden door de nucleotidesequentie van het gewenste transgen te wijzigen naargelang de gastheerplant, zonder de aminozuursequentie aan te tasten. Dit wordt geïllustreerd in paragraaf 1.3.1.1. Het codongebruik dat verkozen wordt door monocotyle en dicotyle planten verschilt (Desai *et al.*, 2010). Zo hebben codons eindigend op G of C de voorkeur in monocotylen (Kawabe en Miyashita, 2003). Ook kan het codongebruik tussen de nucleus en plastiden in dezelfde gastheerplant verschillen (Sharma en Sharma, 2009; Desai *et al.*, 2010).

1.2.2 Epigenetisch niveau

Het epigenetisch niveau vormt het tweede niveau waarop factoren werden geïdentificeerd die variatie in transgenexpressie bij planten teweegbrengen. Epigenetica wordt gedefinieerd als ‘de studie van mitotische en/of meiotisch overerfbare veranderingen in het functioneren van een gen die niet verklaard kunnen worden door veranderingen in de DNA-sequentie van dit gen’ (Vaucheret *et al.*, 1998a). De epigenetica bestudeert met ander woorden de moleculaire reactiewegen die reguleren hoe genen ‘verpakt’ worden in het chromosoom en tot expressie gebracht worden, met effecten die overerfbaar zijn doorheen celdelingen en verschillende plantengeneraties (Grant-Downton en Dickinson, 2005)

Om structuur te brengen in het complex epigenetisch netwerk wordt deze materie beschouwd als steunend op drie pijlers (Grant-Downton en Dickinson, 2005):

- (i) chromatine
- (ii) ‘small interfering’ RNA (siRNA)
- (iii) DNA methylatie

1.2.2.1 Positie-effecten

Ten eerste worden epigenetische effecten besproken die steunen op pijler (i). De DNA-sequentie in de nucleus moet beschouwd worden als een gestructureerd polymeer dat verpakt wordt in functionele chromosomen door histonen. Eerst vormen paren van H3, H4, H2A en H2B histonen een octameer. Vervolgens wikkelen ca. 150 bp DNA in twee draaien rondom deze eenheid om een nucleosoom te vormen. Verschillende nucleosomen worden gescheiden door ‘linker’-sequenties die op hun beurt geassocieerd zijn met ‘linker’-histonen, zoals H1. Deze nucleosomen worden dan geordend ter vorming van een chromatinevezel. De hogere orde-structuur die op deze manier gevormd wordt, is een dynamisch geheel. Er zijn regio’s van dichte heterochromatine aanwezig, alsook regio’s van open euchromatine (Grant-Downton en Dickinson, 2005). Het is van belang op

te merken dat het transgeen DNA integreert op een willekeurige locatie in het plantengenoom. De negatieve invloeden die uitgeoefend worden op de expressie van transgenen door naburig plant-DNA of ongunstige integratieplaatsen in het genoom staan bekend onder de noemer ‘chromosomale positie-effecten’ (Matzke en Matzke, 1998; Kumar *et al.*, 2006a). Dit wil zeggen dat transgenen die integreren in of in de nabijheid van gecondenseerd chromatine niet actief zullen zijn. Daarentegen zullen transgenen die integreren in ontspannen of open chromatine wel actief zijn (Kumar *et al.*, 2006a). Positie-effecten, die samenhangen met de integratieplaats van het T-DNA na planttransformatie, vormen dus een eerste factor die variatie in transgenexpressie veroorzaken op epigenetisch niveau.

1.2.2.2 Neerwaartse genregulatie

Ten tweede worden epigenetische effecten besproken die steunen op pijler (ii) en (iii). De gangbare interpretatie van het centraal dogma van de moleculaire biologie was dat informatieoverdracht op een lineaire manier verliep van DNA, via RNA, naar eiwit. De rol van het RNA als intermediair werd echter onderschat (Grant-Downton en Dickinson, 2005). Bepaalde ‘small RNA’s’ (sRNA’s) van 25 nt lang, ‘small interfering RNA’s’ (siRNA’s) genaamd, vervullen namelijk een centrale rol in twee mechanismen die steeds meer aan belang winnen om de variatie van transgenexpressie in planten te verklaren. Deze mechanismen veroorzaken een neerwaartse genregulatie of ‘silencing’ op transcriptioneel en post-transcriptioneel vlak, resp. transcriptionele ‘silencing’ (TGS) en post-transcriptionele ‘silencing’ (PTGS) (Vaucheret *et al.*, 1998a; Butaye *et al.*, 2005). Zij worden beschouwd als verdedigingsmechanismen van planten op DNA- en RNA-niveau.

TGS wordt gedefinieerd als een mechanisme van neerwaartse genregulatie waarbij de synthese van het mRNA-transcript van een transgen of endogeen gen in de nucleus geïnhibeerd wordt, zodat de transcriptie niet kan doorgaan. Dit gebeurt vaak door DNA-methylatie van de promotor op de cytosinebase en condensatie van chromatine (Vaucheret en Fagard, 2001; Müller, 2010). De epigenetische effecten die door TGS veroorzaakt worden steunen bovendien ook op pijler (iii). Methylatie van de cytosinebase van de DNA-streng wordt namelijk in verband gebracht met neerwaartse genregulatie en kan zodoende variatie in transgenexpressie teweegbrengen (Grant-Downton en Dickinson, 2005).

PTGS wordt gedefinieerd als een mechanisme van ‘neerwaartse genregulatie’ waarbij een sequentie-specifieke inactivatie van een transgen of endogeen gen plaatsvindt door degradatie van het mRNA, vanzelfsprekend na transcriptie. Bovendien wordt ook de expressie geïnhibeerd van genen homoloog aan het neerwaarts gereguleerde gen (Butaye *et al.*, 2005; Brodersen en Voinnet,

2006; Müller, 2010). PTGS wordt ook vermeld onder de namen ‘homology dependent gene silencing’ (HDGS), ‘RNA-interference’ (RNAi) en ‘RNA-silencing’. Het gedetailleerd mechanisme van verschillende PTGS-reactiewegen wordt opgehelderd in paragraaf 1.3.3.2. Wel wordt hier ingegaan op een belangrijk factor die aan de basis ligt van de epigenetische effecten die verband houden met PTGS. Deze factor is de inconsistentie van het kopij-aantal van transgenen. Eén of meerdere intacte of herschikte kopijen van een transgen kunnen integreren op één of meerdere loci in het genoom (Vaucheret *et al.*, 1998a). Theoretisch gezien zou een verhoging in het kopij-aantal een verhoging in het expressieniveau van het transgen met zich meebrengen. In de praktijk blijkt echter het tegendeel. Complexe integratiepatronen als herhalingen *in tandem* en omgekeerde herhalingen van het transgen geven aanleiding tot een verlaagd expressieniveau (Hobbs *et al.*, 1993). In deze context wordt PTGS eerder aangeduid met de term HDGS (Vaucheret *et al.*, 1998a; Butaye *et al.*, 2005).

PTGS en TGS lijken op het eerste zicht twee volledig verschillende reactiewegen, toch zouden zij beide afkomstig zijn van éénzelfde oeroud mechanisme. Er worden namelijk steeds meer verbanden tussen deze twee mechanismen van neerwaartse genregulatie ontdekt. Een eerste raakpunt zijn de sRNA's die in beide reactiewegen een belangrijke rol spelen. Deze RNA-species zijn dubbelstrengig, 20 tot 30 nucleotiden (nt) lang en associëren met specifieke eiwitten om een effectorcomplex te vormen. Deze onvertaalde RNA's kunnen ingedeeld worden in een aantal klassen, waaronder microRNA's (miRNA's) en ‘small interfering RNA's’ (siRNA's) het meest bestudeerd werden. In PTGS spelen zowel miRNA's als siRNA's een rol om de afbraak van mRNA te leiden. In TGS speelt een unieke klasse van siRNA's, namelijk ‘repeat associated’ (ra)-siRNA's, een rol om de methylering van DNA-sequentie te leiden (Brodersen en Voinnet, 2006; Eamens *et al.*, 2008; Czech en Hannon, 2011). Een tweede raakpunt is dat gemethyleerd DNA vermoedelijk als matrijs fungeert voor de transcriptie van ‘aberrant’ RNA door het RNA polymerase II (RDR2) of het plantspecifieke polymerase PolIVa. Dit is noodzakelijk voor het behoud van PTGS (Eamens *et al.*, 2008).

Ook vallen enkele verschilpunten op tussen PTGS en TGS. Neerwaartse genregulatie door PTGS is niet overerfbaar via meiose, maar in enkele gevallen kan dit behouden worden gedurende de levenscyclus van een plant, zelfs na het verdwijnen van het signaal dat neerwaartse genregulatie initieerde. Neerwaartse genregulatie door TGS is daarentegen wel overerfbaar via mitose en meiose, maar deze vorm van neerwaartse genregulatie kan opgeheven worden wanneer de DNA-methylering van de promotor verloren gaat (Vaucheret *et al.*, 1998a; Müller, 2010). Uniek aan PTGS

is dat dit mechanisme zich systemisch kan verspreiden doorheen de plant en overdraagbaar is na enting, in tegenstelling tot TGS (Müller, 2010).

1.3 Optimalisatie van transgenexpressie in planten

In deze paragraaf wordt nagegaan welke benaderingen meer stabiliteit brengen in de expressie van transgenen in planten. Om te beginnen worden de verschillende technieken overlopen (paragraaf 1.3.1). Analoog aan paragraaf 1.2 wordt gestart op genetisch niveau (paragraaf 1.3.1.1) en wordt er vervolgd met een aantal benaderingen die een effect kunnen hebben op epigenetisch niveau (paragrafen 1.3.1.2, 1.3.1.3 en 1.3.1.4).

Vervolgens vormen ‘matrix attachment regions’ (MARs) een eerste focuspunt in paragraaf 1.3.2. Deze benadering staat namelijk centraal in het experimenteel gedeelte van deze thesis. Meer bepaald wordt getracht de expressie van een transgen te optimaliseren in banaan (*Musa spp.*) door dit gen te flankeren met MARs. Ten slotte vormt RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6 (RDR6) een tweede focuspunt in paragraaf 1.3.3. Dit element speelt een rol in een aantal reactiewegen voor PTGS en de neerwaartse regulatie van RDR6 zal aangewend worden om de transgenexpressie in banaan te optimaliseren.

1.3.1 Benaderingen om transgenexpressie te optimaliseren

1.3.1.1 Hogere expressie ‘op maat’

TRANSCRIPTIE

Om een gewenst expressieniveau te bekomen, kan men om te beginnen het gewenste transgen aansturen met behulp van de juiste promotor. De keuze van de optimale promotor steunt veelal op experimentele gegevens en ‘trial and error’. De algemene voor- en nadelen van de hieronder beschreven promotors kunnen namelijk verschillen in elke situatie. Telkens zal kort verwezen worden naar de huidige kennis over de activiteit van deze promotors in *Musa spp.* Men kan promotors indelen in drie categorieën op basis van hun activiteit:

- **Constitutieve promotors** induceren de genexpressie volledig onafhankelijk van omgevingsignalen, het ontwikkelingsstadium of het weefsel van de plant. Zij staan met ander woorden constant ‘aan’ (Sharma en Sharma, 2009). Constitutieve promotors worden in het algemeen verondersteld het transgenexpressieniveau het meest te maximaliseren en kunnen omwille van dit voordeel gebruikt worden. Een nadeel is echter dat een hoge expressie kan leiden tot PTGS. Dit negatief effect werd

voornamelijk bij promotors van virale oorsprong waargenomen. Constitutieve promotors afkomstig van planten vertoonden dit negatief effect beduidend minder (Desai *et al.*, 2010). In *Musa spp.* wordt o.a. gebruik gemaakt van de T600 promotor afkomstig uit het ‘*Taro bacilliform virus*’ (TaBV) (Yang *et al.*, 2003), de UBI1 promotor uit *Z. mays* en de actine1 promotor uit *O. sativa* (Arinaitwe, 2008). De actine1 promotor afkomstig uit *Musa spp.* zelf drijft een bijna-constitutieve transgenexpressie aan in vegetatief weefsel (Hermann *et al.*, 2001).

- **Weefsel specifieke promotors** induceren de genexpressie op een manier die afhankelijk is van het plantenweefsel of het ontwikkelingsstadium waarin het gen zich bevindt. Deze promotors kunnen aangewend worden om transgenen tot expressie te brengen in een specifiek plantenorgaan. In tegenstelling tot constitutieve promotors hebben zij daardoor het voordeel minder te interfereren met het volledige plantenmetabolisme. Bovendien treedt op deze manier minder PTGS op (Sharma en Sharma, 2009). In *Musa spp.* drijven bijvoorbeeld promotors BT1 tot BT5 uit het ‘banana bunchy top virus’ (BBTV) de expressie van transgenen voornamelijk in cellen geassocieerd met vasculair weefsel (Dugdale *et al.*, 2000).
- **Induceerbare promotors** worden aangeschakeld door chemische componenten of omgevingsignalen. Net als weefsel specifieke promotors bieden induceerbare promotors het voordeel minder te interfereren met het metabolisme en de ontwikkeling van een plant. Een bijkomend voordeel is dat de transgenexpressie zeer specifiek gereguleerd kan worden op voorwaarde dat de inductor gekenmerkt wordt door een hoge specificiteit voor de promotor en een snelle aan- en uitschakeling kan bewerkstelligd worden (Sharma en Sharma, 2009). In *Musa spp.* werd bijvoorbeeld de PR-10 promotor uit *Medicago sativa* gebruikt om genen tot expressie te brengen die de tolerantie tegen schimmelziekten in Cavendish bananen verbeteren. Deze promotor werd aangeschakeld door UV-licht (Vishnevetsky *et al.*, 2010).

Na transcriptie vindt de ‘processing’ van het RNA plaats. In dit proces worden bij eukaryoten introns verwijderd uit het pre-mRNA (Desai *et al.*, 2010). Er werd vastgesteld dat het gebruik van intron-I uit het *shrunken-I* gen van *Z. mays* aan de 5’-zijde van het reportergen een 100-voudige toename in expressie teweegbracht (Maas *et al.*, 1991). In *Musa spp.* deed bijvoorbeeld de aanwezigheid van het rijst actine1 en het maïs ubi1 intron de activiteit van de BT6 promotor afkomstig uit BBTV resp. 300- en 100-voudig toenemen (Dugdale *et al.*, 2001).

Uiteindelijk dient na transcriptie het bekomen mRNA gestabiliseerd te worden. De 3' UTR (untranslated region) is een onvertaalde regio die een belangrijke rol speelt bij de stabilisatie van het mRNA. Het bevat namelijk de boodschap voor polyadenylatie van het transcript, dus het beïnvloedt direct mRNA stabiliteit (Sharma en Sharma, 2009). Ook bevatten 3' UTR omgekeerde herhalingen die kunnen opgevouwd worden in stem-lusstructuren en een bescherming bieden tegen exoribonucleasen (Kole, 2010). 3' UTR's afkomstig uit planten of plantvirussen werden reeds gebruikt om de productie van recombinante eiwitten in planten te verbeteren. Zo werd bijvoorbeeld een 3' UTR uit het α Amy3 gen van rijst gebruikt om de productie van humaan serum albumine in rijst te optimaliseren (Huang *et al.*, 2005) en een 3'-UTR uit het 'tobacco mosaic virus' (TMV) kon de expressie van een heteroloog eiwit in tarwe drievoudig verhogen ten opzichte van controles zonder 3' UTR (Zeyenko *et al.*, 1994)

TRANSLATIE

Om de transgenexpressie in planten te optimaliseren, kan men ook ter hoogte van de translatie ingrijpen. Ten eerste kan dit door gebruik van 5' UTR's. Zo brachten bijvoorbeeld de frequent gebruikt 5' UTR's uit TMV en het 'alfalfa mosaic virus' (AMV) een verhoging van transgenexpressie teweeg van resp. 5,4 en 3 maal in tabak (Zeyenko *et al.*, 1994). Een handvol andere toepassingen met UTR's afkomstig van plantenvirussen worden beschreven in Sharma en Sharma (2009). Ook een 5' UTR uit het polyubiquitinegen *rubi3* van rijst kon de *gus*-expressie op zowel mRNA-niveau, als translationeel niveau verhogen (Samadder *et al.*, 2008). Ten tweede kan ook een aangepast codongebruik de transgenexpressie optimaliseren. Zo steeg bijvoorbeeld de geproduceerde hoeveelheid cholera toxine B 10-voudig in transgene tomaat (*Lycopersicon esculentum L.*) door aangepast codongebruik (Loc *et al.*, 2011)

1.3.1.2 Positie-effecten verhinderen

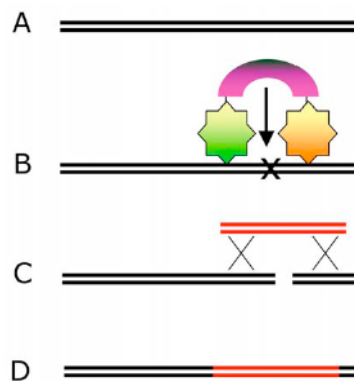
Er werden verschillende strategieën ontwikkeld om positie-effecten te verhinderen. Ten eerste kan een transgen afgeschermd worden van deze effecten door toedoen van MARs. Ten tweede kan de integratieplaats van het transgen gecontroleerd worden door homologe recombinatie of plaats-specifieke integratie. Op deze manier tracht men de willekeurige integratie van transgenen in het plantengenoom in te perken. Ten derde kan de transformatie van andere organellen dan de nucleus beoogd worden. Het DNA dat aanwezig is in plastiden is namelijk niet onderhevig aan epigenetische 'silencing' effecten (Bock, 2007).

MATRIX ATTACHMENT REGIONS (MARS)

De effecten van MARS op het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie in planten komen uitgebreid aan bod in paragraaf 1.3.2.

HOMOLOGE RECOMBINATIE

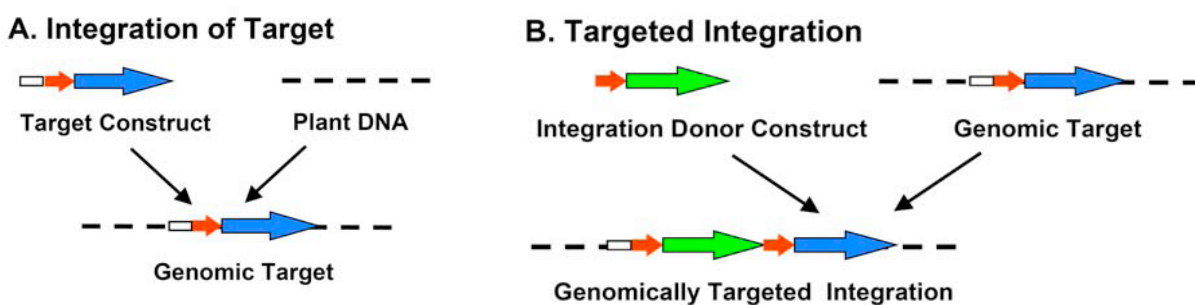
Homologe recombinatie is een complex proces waarbij DNA-segmenten uitgewisseld worden die een significante homologie delen in hun sequenties. Dit proces is in eukaryoten betrokken bij het behoud van het genoom door o.a. DNA-herstel, replicatie en behoud van telomeren (Lieberman-Lazarovich en Levy, 2011). Door gebruik te maken van dit proces zou men in theorie elk gewenst transgen op elk gewenst locus in het plantengenoom te laten integreren. In de praktijk is de frequentie waarmee een transgen op een specifieke plaats in het genoom integreert echter laag: 10^{-4} tot 10^{-5} (Kumar *et al.*, 2006a). Sedert lange tijd is geweten dat dubbelstrengige breuken (DSB) ter hoogte van de gewenste integratieplaats in het genoom de homologe recombinatie kan verbeteren (Kumar *et al.*, 2006b). Deze DSB kunnen op specifieke plaats in het genoom geïnduceerd worden door zink-vinger endonucleasen (ZFN's). Op deze manier worden de recombinatie en herstelprocessen op specifieke plaatsen gestimuleerd (Kumar *et al.*, 2006b; Figuur). Deze aanpak zou zeer krachtig kunnen worden, aangezien reeds een 10^4 -voudige verhoging van de homologe integratiefrequentie werd genoteerd ten opzichte van de klassieke homologe recombinatie (Wright *et al.*, 2005). Een voordeel aan ZFN's is dat ze eenvoudig manipuleerbaar zijn, zodat ze allerlei doelwitsequenties kunnen herkennen om DSB te induceren. Zodoende wordt het mogelijk een transgen op een specifieke plaats in het genoom te insereren (Cai *et al.*, 2009). Een nadeel is echter dat op dit moment nog 'off-target' breuken aangetroffen worden bij het gebruik van ZFN's en er een mogelijke cytotoxiciteit is. Toch wordt deze techniek als veelbelovend beschouwd in de wereld van de plantenbiotechnologie (Kumar *et al.*, 2006b).



Figuur 1 Homologe recombinatie gemedieerd door zink-vinger nucleasen (ZFN's). A: het doelwitgen. B: ZFN binden op een specifieke plaats en introduceren een dubbelstrengige breuk in het doelwitgen. C: de dubbelstrengige breuk herstelt door fragmenten van gewenst donor DNA (rood) te gebruiken. Er treedt hier homologe recombinatie op. D: het doelwitgen bevat nu de gewenste donorsequentie (Kumar *et al.*, 2006a).

PLAATS-SPECIFIEKE INTEGRATIE

Plaats-specifieke recombinatie is een mechanisme dat natuurlijk voorkomt in prokaryoten en lagere eukaryoten o.a. voor de integratie van een bacteriofaag in het gastheergenoem, het behoud van het kopij-aantal of het versnellen van het replicatieproces (Lyznik *et al.*, 2003). De techniek die hierop gebaseerd is, steunt op twee componenten: een plaatsspecifiek recombinase en een herkenningsplaats op zowel de donor van het transgen, als de doelwitplaats in het genoom. Er zijn hiervoor verschillende systemen mogelijk in planten: Cre-*lox* (plaats-specifiek recombinase - 'locus of crossing over' uit bacteriofaag P1), Flp-*FRT* (Flippase-'Flippase Recognition Target' uit gist) en R-*RS* (plaats-specifiek recombinase-'Recombination Site' uit gist) worden frequent gebruikt (Kumar *et al.*, 2006a). Via deze techniek is het mogelijk DNA op een welbepaalde plaats in het genoom te insereren of te verwijderen (Srivastava en Ow, 2004; Ow, 2007). De werking van deze techniek wordt uitgelegd voor de plaats-specifieke integratie van gewenste transgenen en dit wordt geïllustreerd in Figuur 2, maar vele variaties hierop zijn mogelijk. Een voordeel aan deze techniek is de voorspelbare en stabiele transgenexpressie die bewerkstelligd wordt, ook doorheen plantengeneraties. Ondanks de succesvolle pogingen om de transgenexpressie te controleren in voornamelijk *Arabidopsis*, tabak en rijst, is plaats-specifieke recombinatie toch geen eenvoudige en frequent gebruikte techniek. Daar kan verandering in komen, indien de kennis van deze techniek uitgebreid wordt en toegepast kan worden in meerdere economisch interessante gewassen (Kumar *et al.*, 2006a).



Figuur 2 Algemeen principe van plaats-specifieke integratie. Het gebruik van plaats-specifieke recombinatiesystemen laat toe gewenst DNA op een specifieke plaats in het genoom te integreren. Om dit te realiseren zijn twee transformatierondes (A en B) nodig. A) In de eerste transformatieronde wordt het doelwitconstruct willekeurig in het plantengenoom geïntroduceerd. Dit doelwitconstruct bevat een herkenningsplaats (*lox*, *FRT*, *RS*) (rode pijl) tussen de promotor (witte rechthoek) en het reporter-gen (blauwe pijl). Vervolgens kan het reporter-gen gevisualiseerd worden, zodat het expressieniveau en -patroon bij een bepaalde integratieplaats gekarakteriseerd kunnen worden. Op deze manier kunnen de transformanten met de gewenste expressie geselecteerd worden voor een tweede transformatieronde. B) In de tweede transformatieronde wordt het donorconstruct plaats-specifiek in het plantengenoom geïntroduceerd. Dit donorconstruct bevat een gewenst gen zonder promotor (groene pijl) en met een herkenningsplaats aan het 5'-uiteinde. Door tussenkomst van een plaats-specifiek recombinase (Cre, Flp, R) kan plaats-specifieke recombinatie optreden en wordt het gewenst gen finaal geflankeerd door de twee gewenste herkenningsplaatsen. Dit kan echter ook leiden tot het verwijderen van het gewenste gen in aanwezigheid van het recombinase (Fukushige en Sauer, 1992; Kumar *et al.*, 2006).

PLASTIDETRANSFORMATIE

Plastidetransformatie is een techniek om transgenexpressie in het genoom van de chloroplast te laten plaatsvinden. Een eerste voordeel is dat een hoge expressie van vreemde eiwitten bereikt kan worden. Ook is deze techniek zeer precies en effectief, aangezien de integratie van transgenen enkel gebeurt via homologe recombinatie. Een derde voordeel is dat de transgenen niet onderhevig zouden zijn aan neerwaartse genregulatie en positie-effecten gezien de plaats specifieke integratie in het chloroplast genoom (Bock, 2007; Clarke *et al.*, 2011).

Chloroplasttransformatie werd reeds frequent toegepast voor het ‘engineeren’ van resistentie-eigenschappen in planten, de modificatie van metabole biosynthesewegen en de productie van farmaceutische componenten in planten. Toch ken de plastidetransformatie nog uitdagingen Ten eerste werden nog geen goed functionerende protocols ontwikkeld voor monocotylen, inclusief belangrijke graangewassen als maïs, rijst en sorghum. Ten tweede is meer onderzoek nodig in de regulatie van genexpressie in andere plastiden dan chloroplasten. Ook is het noodzakelijk een systeem te ontwikkelen om de transgenexpressie sterk te controleren en te richten in bepaalde weefsels (Bock, 2007; Clarke *et al.*, 2011).

1.3.1.3 Neerwaartse genregulatie reduceren

Er werden verschillende strategiën ontwikkeld om neerwaartse genregulatie of ‘silencing’ te reduceren. Enerzijds kan het kopij-aantal verlaagd worden om PTGS te verhinderen. Anderzijds kan via virale suppressors of mutanten gebruik gemaakt worden van planten waarin PTGS onderdrukt of uitgeschakeld is.

KOPIJ-AANTAL VERLAGEN

‘Single-copy’ transformanten worden vaak verkozen in fenotypische analyses, maar zij garanderen geen voorspelbare expressieniveaus van transgenen (De Wilde *et al.*, 2001; Butaye *et al.*, 2005). Algemeen gesteld bekomt men via directe DNA-transfermethoden een hoog kopij-aantal, terwijl transformatie met behulp van *Agrobacterium* een kopij-aantal kleiner dan tien zou genereren en meer ‘single-copy’ transformanten (Arinaitwe, 2008). Voor het ophelderden van de correlatie tussen het kopij-aantal en andere factoren dan de transformatiemethode zijn meer testen noodzakelijk. Deze factoren kunnen de gebruikte *Agrobacterium*-stam, het plantenspecies en het type ‘explant’ van de gastheerplant omvatten (Butaye *et al.*, 2005).

VIRALE SUPPRESSORS

Virussen hebben zich in de loop van de evolutie aangepast aan mechanismen van neerwaartse genregulatie die hen verhinderden planten te infecteren en zich te verspreiden. Bepaalde virale eiwitten onderdrukken PTGS en kunnen met andere woorden ook gebruikt worden om de negatieve invloed van PTGS op transgenexpressie te verminderen. Een eerste virale suppressor voor PTGS werd samengesteld met het helper component-proteïnase HC-Pro uit ‘tobacco etch virus’ (TEV) en het amplicon uit PVX ‘potato virus X’ (PVX). De suppressor kon de accumulatie van een heteroloog eiwit in tabak verhogen (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Mallory *et al.*, 2002). Een andere virale suppressor voor PTGS is p19 uit het ‘tomato bushy stunt virus’. Door de aanwezigheid van deze suppressor kon de productie van een heteroloog eiwit 50-voudig verhoogd worden (Voinnet *et al.*, 2003). Een nadeel van bovenvernoemde benaderingen is dat fenotypische afwijkingen werden waargenomen bij planten die virale suppressors tot expressie brengen (Pruss *et al.*, 2004). Dit betekent dat deze benadering eerder geschikt is voor de productie van (heterologe) eiwitten dan voor gericht reduceren van transgen ‘silencing’ om meer voorspelbare transgenexpressie te bekomen. Men spreekt in dit kader ook van ‘molecular farming’.

MUTANTEN VOOR PTGS

Dankzij groeiende inzichten in de mechanismen van PTGS konden PTGS-mutante planten ontwikkeld worden om een meer voorspelbare transgenexpressie te bekomen. Net zoals virale suppressors, zijn mutanten voor PTGS eerder geschikt voor onderzoekdoeleinden of voor de expressie van (heterologe) eiwitten. Een concrete aanpak en resultaten van deze benadering worden beschreven in paragraaf 1.3.2.4.

1.3.2 Focus 1: Matrix Attachment Regions (MARs)

1.3.2.1 Inleiding: definitie, eigenschappen en detectie

De eerste benadering om transgenexpressie te optimaliseren in deze thesis bestaat in het gebruik van ‘matrix attachment regions’ (MARs). MARs zijn DNA-elementen die aan de nucleaire matrix van eukaryoten binden (Mirkovitch *et al.*, 1984). De nucleaire matrix wordt beschreven als een dynamisch, vezelachtig netwerk met een structurele functie in de nucleus. Dit netwerk bestaat grotendeels uit eiwitten die voornamelijk betrokken zijn bij de verwerking en het transport van RNA (Holmes-Davis en Comai, 1998). Enerzijds interageert de nucleaire matrix met cytoskeletale elementen in het cytoplasma, anderzijds zijn er in de nucleus op bepaalde plaatsen chromatinevezels aan deze matrix gehecht (Wan *et al.*, 1999). MARs worden gedefinieerd aan de

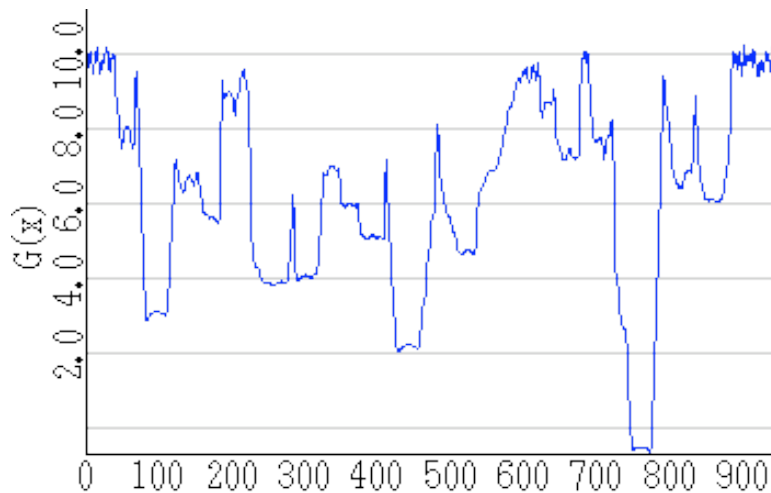
hand van twee criteria: (i) endogene DNA-fragmenten die samen met de nucleaire matrix opgezuiverd worden en (ii) DNA-fragmenten die exogeen toegevoegd worden en *in vitro* binden aan de opgezuiverde nucleaire matrix in aanwezigheid van competitor DNA (Allen *et al.*, 2000; Abranches *et al.*, 2005). Deze criteria steunen op de endo- en exogene *in vitro*-bindingstesten waarmee de aanwezigheid van MARs gedetecteerd wordt in bepaalde DNA-sequenties. De definitie van MARs is met andere woorden gebaseerd op de detectiemethode (Spiker en Thompson, 1996; Bode *et al.* 2000). MAR-elementen verschijnen in de literatuur onder een aantal verschillende namen: ‘scaffold attachment regions’ of SARs, grenselementen of ‘boundary elements’, bepaalde isolatortypes van chromatine en S/MARs, een combinatie van ‘scaffold’ en ‘matrix attachment regions’ (Allen, 2008). In deze thesis wordt geopteerd voor de meest gangbare term: MARs.

In het ontrafelen van de structuur-functie relatie wordt gezocht naar eigenschappen die MARs typeren:

- Grootte: 300 tot 5000 bp (Harraghy, 2008).
- Localisatie in het genoom: voornamelijk niet-coderende regio’s (Bode *et al.*, 2000). Toch werden MARs ook gedetecteerd in 5’ UTR, eiwit-coderende exons en introns van voornamelijk genen coderend voor transcriptiefactoren (Tetko *et al.*, 2006).
- Motieven in MAR-sequenties: de aanwezigheid van de ‘90% AT-box’ zou het best correleren met de aanwezigheid en de bindingssterkte van een MAR-element in een bepaalde sequentie. De ‘90% AT-box’ is een sequentie van 20 nucleotiden waarvan 18 of meer A of T zijn. (Michalowski *et al.*, 1999). Voor een volledige opsomming van alle mogelijke motieven in MAR-sequenties wordt verwezen naar het MAR-Wiz computerprogramma (Singh *et al.*, 1997; www.futuresoft.org/modules/MarFinder/index).
- Structurele eigenschap: de DNA-strengen van een MAR-sequentie ontwinden wanneer ze onder negatieve superhelische druk worden geplaatst. Dit werd *in vivo* getest en *in vitro* aan de hand van verschillende zoutconcentraties en chemische reagentia (Bode *et al.*, 1992; Bode *et al.*, 1996). Men spreekt in dit kader van ‘stress-induced DNA duplex destabilization’ (SIDD). De ontubbeling van de DNA-helix start steeds op de locatie die het best gedestabiliseerd wordt, namelijk het ‘core-unpairing element’ (CUE) (AATATATTT) (Bode *et al.*, 1997). Vervolgens verspreidt deze ontubbeling zich via ‘base-unpairing regions’ (BURs) die sterk afgebakende grenzen bezitten (Bode *et al.*, 2006).

Initieel bleken *in silico* analyses op basis van motieven een betrouwbare techniek om de aanwezigheid van MARs in een gegeven sequentie te voorspellen. Achteraf bleek echter dat noch *in silico*-analyses, noch *in vitro*-bindingstesten waarop de definitie en detectie van MARs

gebaseerd is, voldoende zekerheid bieden om MARs op correcte wijze te detecteren (Bode *et al.*, 2006). Een betere techniek om MARs te detecteren en hun bindingssterkte met de nucleaire matrix te bepalen, is gebaseerd op de neiging van de DNA-duplex om lokaal gedestabiliseerd te worden onder stress, want dit kan berekend worden. Er is namelijk een kwantitatief verband tussen de SIDD-eigenschappen van MARs en hun *in vitro* bindingsactiviteit, de stressgeïnduceerde duplexdestabilisatie (SIDD)-analysetechniek is hierop gebaseerd. In deze analyse wordt berekend in welke mate een opgelegde superhelische druk de vrije energie doet dalen die nodig is om de DNA-duplex te openen op elke positie van een DNA-sequentie. Dit resulteert in een SIDD-profiel dat weergegeven wordt in Figuur 3 (Bode *et al.*, 2006).



Figuur 3 Het ‘stress-induced DNA duplex destabilization’ (SIDD)-profiel van H9 MARs uit *N. tabacum*. De x-as komt overeen met de lengte van de DNA-sequentie. De y-as geeft de vrije energie $G(x)$ weer die nodig is voor een volledige ont koppeling van basepaar x , wanneer dit onder eenzelfde superhelische druk geplaatst wordt. Regio’s met een sterke destabilisatie komen overeen met sterke minima van vrije energie in het SIDD-profiel en zijn ‘base-unpairing regions’ (BUR’s). Het diepste minimum komt overeen met het ‘core unwinding element’ (CUE) (Bi en Benham, 2004).

1.3.2.2 Functies en hypothetische werkingsmodellen

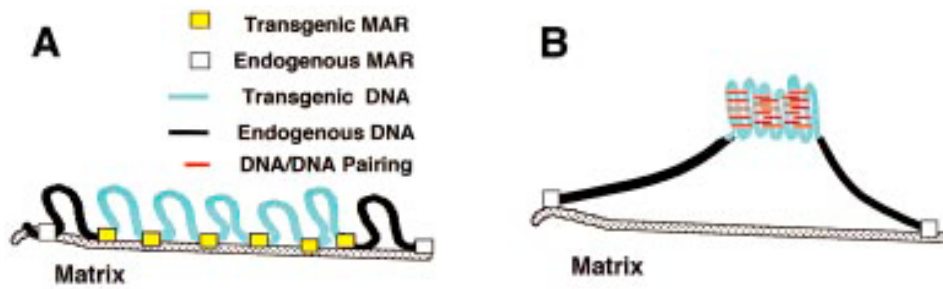
Een brede waaier aan functies wordt toegeschreven aan MARs: de organisatie van chromatine, het verbeteren van transgenintegratie, het isoleren van transgenen en het bevorderen van transcriptie. Aan deze vier functies wordt een model gekoppeld dat de werking van MARs (hypothetisch) tracht te verklaren.

Allereerst treden MARs tussenbeide in de organisatie en regulatie van chromatine. Hun natuurlijke rol bestaat er namelijk in chromatinelussen te laten aanhechten aan de nucleaire matrix. Ze vormen als het ware verankeringspunten en worden beschouwd als belangrijke elementen voor de hogere ordestructuur van chromatine in de celkern. Op deze manier kunnen ze ook de topologie van het genoom in celkernen veranderen gedurende de interfase. Het chromatine openingsmodel beschrijft

namelijk dat chromatine gecompacteerd en geopend wordt door de interactie van resp. het H1 histon en het niet-histon chromatine-eiwit HMG I/Y met MARs. Deze eiwitten worden aangetrokken door de AT-rijkheid van MARs (Allen *et al.*, 2000; Allen, 2008). Enerzijds zouden MARs een structurele functie beoefenen, aangezien ze door de verankering van chromatine aan de matrix de verdeling in heterochromatine en euchromatine bewerkstelligen. Anderzijds zouden MARs ook een regulatorische functie beoefenen, aangezien ze transcriptiefactoren en chromatine remodellerings-eiwitten rekruteren die het chromatine lokaal wijzigen. Hieronder verstaat men onder andere histon deacetylases en histon acetyltransferases. Deze enzymen interageren met de MAR-elementen en zullen chromatine resp. minder of meer toegankelijk maken (Harraghy *et al.*, 2008). Een aantal MAR-bindende eiwitten die een rol spelen in het functioneel netwerk van de nucleaire matrix worden aangetrokken door BUR's in de MARs zelf (Bode *et al.*, 2006).

Ten tweede zouden MARs de integratie van transgenen kunnen verbeteren. In zowel *O. sativa* als *Arabidopsis* werden ze aangetroffen in het DNA dat de integratieplaatsen van een transgen flankiert. Er wordt door meerdere onderzoekers gesteld dat MARs 'hotspots' voor integratie vormen of het integratieproces van een transgen vergemakkelijken. Dit zou bijvoorbeeld met de hulp van het eerder vernoemd histon H1 en HMG I/Y kunnen gebeuren. Het is niet uitgesloten dat transgenen worden geleid naar de actievare chromatinedomeinen in het genoom door tussenkomst van MARs (Allen *et al.*, 2000).

Ten derde fungeren MARs als isolator of grenselement van transgeen DNA. Twee MARs die een gen omringen ontkoppelen het van positie-effecten in het chromosoom. Er zijn namelijk genrijke regio's gelegen in het gedecondenseerd euchromatine waar transgenen actief zijn en hoog repetitieve regio's gelegen in het gecondenseerd heterochromatine waar transgenen niet actief zijn. MARs scheiden deze chromosomale domeinen en verhinderen de verspreiding van gedecondenseerd chromatine, hoogstwaarschijnlijk in samenwerking met het histon H2A.Z. Bovendien reduceren ze de DNA:DNA paringsinteracties in complexe loci. Het 'carpet tack'-model visualiseert hoe MARs *cis* interacties vermijden tussen verschillende kopijen van een transgen op eenzelfde locus (Allen *et al.*, 2000; Figuur 4). Zodoende kan ook homologie-afhankelijke 'silencing' (HDGS) in planten vermeden worden. MARs spijkeren als het ware de naburige kopijen van een transgen vast aan de nucleaire matrix en vormen een fysische barrière. Ze kunnen dit gunstig effect echter niet blijven volhouden wanneer het kopij-aantal van het transgen een bepaald kritisch niveau bereikt (Abranches, 2005; Bode *et al.*, 2000; Allen, 2008).



Figuur 4 Het ‘carpet tack’-model verklaart hoe MARs als isolator van transgenen fungeert. MARs hechten aan de nucleaire matrix en vormen een fysieke barrière tussen naburige kopijen van een transgen, waardoor DNA:DNA-paringsinteracties vermeden worden. Op deze manier wordt neerwaartse genregulatie vermeden die geïnduceerd wordt door herhalingen van transgenen. In deel A van de Figuur zijn MARs rondom transgenen aanwezig, in deel B niet (Allen *et al.*, 2000).

Ten vierde bevorderen MARs de transcriptionele activiteit van genen. Enerzijds zouden zij als een soort ‘enhancer’ de transcriptie bevorderen, maar enkel na integratie in het genoom. Anderzijds zouden zij fungeren als sterke terminators. Op deze manier wordt de transcriptie van naburige repetitieve sequenties vermeden, alsook transcriptionele doorleesactiviteit op plaatsen waar verschillende kopijen van een transgen naast elkaar integreerden in het genoom. Dit kan op zijn beurt TGS reduceren (Harraghy *et al.*, 2008; Abranches, 2005; Bode *et al.*, 2000).

Ten slotte is het duidelijk geworden dat vele mogelijke hypothesen de werking van MARs trachten te verklaren. In de volgende paragraaf zal dieper ingegaan worden op de gerapporteerde effecten van MARs tijdens de transgenexpressie op basis van experimentele data. Bovendien wordt het verband gelegd tussen MARs en neerwaartse genregulatie.

1.3.2.3 Effecten en toepassingen

De effecten van MARs op het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie werden reeds onderzocht in verschillende planten. In deze thesis worden deze data daterend van 1992 tot op heden overzichtelijk samengezet in Tabel 1. Er werd verdergebouwd op een reeds bestaande tabel die de effecten van MARs beschreef in onderzoeken van 1992 tot 2000 (Allen *et al.*, 2000). Vervolgens worden de data in deze tabel geïnterpreteerd en aangevuld.

Tabel 1 De effecten van flankerende MARs op het expressieniveau en de variabiliteit van expressie van een transgen in verschillende plantensoorten.

Plantensoort - Type cultuur	Naam - Bron van MARs	Promotor-reporter	DNA-transfer	Effect op niveau van expressie	Effect op variabiliteit van expressie	Referentie
<i>Dicotylen</i>						
<i>N. tabacum</i> - SC	P1 - sojaboon β-globine - mens	<i>NOS-gus</i> <i>NOS-gus</i>	AB	2 x ↓ 1,4 x ↗	15,4 x ↓ geen	Breyne <i>et al.</i> , 1992
<i>N. tabacum</i> - plant	Gmhsp - sojaboon	<i>hitteschok geïnduceerd-gus</i>	AB	9 x ↗	geen	Schöffl <i>et al.</i> , 1993
<i>N. tabacum</i> - SC	ARS - gist	<i>35S-gus</i>	PB	12 x ↗	6,3 x ↗	Allen <i>et al.</i> , 1993
<i>N. tabacum</i> - plant	B1-X1 - kip B1-X1 - kip	<i>Lhca3-gus</i> <i>Lhca3-gus</i>	AB	4 x ↗ 3 x ↗	3 x ↓ 7 x ↓	Mlynarova <i>et al.</i> , 1994
<i>N. tabacum</i> - plant	β-faseolin - boon	<i>faseolin-gus</i>	AB	3 x ↗	2 x ↓	van der Geest <i>et al.</i> , 1994
<i>N. tabacum</i> - plant	B1-X1 - kip B1-X1 - kip	<i>Enh35S-gus</i> <i>Enh35S-gus</i>	AB	2 x ↗ 2 x ↗	2 x ↓ 7 x ↓	Mlynarova <i>et al.</i> , 1995
<i>N. tabacum</i> - SC	Rb7 - tabak	<i>35S-gus</i>	PB	60 x ↗	geen	Allen <i>et al.</i> , 1996
<i>N. tabacum</i> - bladschijf	Rb7 - tabak	<i>35S-gus</i>	AB	2 x ↗	NB	Han <i>et al.</i> , 1997
<i>N. tabacum</i> - plant	At - <i>Arabidopsis</i>	<i>35S-gus</i>	AB	5-10 x ↗	geen	Liu en Tabe, 1998
<i>N. tabacum</i> - plant	Rb7-tabak	<i>35S-gus</i>	PB	2 x ↗	geen	Ülker <i>et al.</i> , 1999
<i>N. tabacum</i> - plant	B1-X1 - kip	<i>Enh35S-luc</i>	AB	0-2 x ↓	geen	Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2001
<i>N. tabacum</i> - plant	B1-X1 - kip	<i>35S-luc</i> <i>Lhca3-gus</i>	AB	geen geen	9-15 x ↓ 13-18 x ↓	Mlynarova <i>et al.</i> , 2002

<i>N. tabacum</i> - SC	Rb7 - tabak	<i>35S/ AtAhas/ NOS/ OCS/ GmHspL/ ferredoxin- gus</i>	PB	5,3/ 1,6 / 4,9/ 15,3/ 3,1/ geen x ↗	NB	Mankin <i>et al.</i> , 2003
<i>N. tabacum</i> - SC	Rb7 - tabak	<i>35S- gfp</i>	AB	2,2 x ↗	matig ↘	Halweg <i>et al.</i> , 2005
<i>A. thaliana</i> - plant	HSC80 - tomaat ARS-1 - gist	<i>APT- Lc</i> <i>APT- Lc</i>	AB	geen 1,8 x ↘	NB NB	Holmes-Davis <i>et al.</i> , 2002
<i>A. thaliana</i> - plant	B1-X1 - kip	<i>35S/ MAS- gus</i>	AB	geen	geen	De Bolle <i>et al.</i> , 2003
<i>A. thaliana</i> - plant	synthetisch	<i>ACT2- gus</i>	AB	1,7-3,7 x ↗	2,3-6,5 x ↗	van der Geest <i>et al.</i> , 2004
<i>A. thaliana</i> : wt plant sgs2 plant sgs3 plant	B1-X1 - kip	<i>35S- gus</i> <i>35S- gus</i> <i>35S- gus</i>	AB	1,7 x ↗ 5 x ↗ 12 x ↗	geen geen geen	Butaye <i>et al.</i> , 2004
<i>A. thaliana</i> : wt plant wt/sgs2	B1-X1 - kip H9 - tabak	<i>35S- gus</i> <i>35S- gus</i> <i>CAS- gus</i>	AB	geen geen/ 5 x ↗ geen/ 5 x ↗	geen geen geen	De Bolle <i>et al.</i> , 2007
<i>Theobroma cacao</i> - embryo	Rb7 - tabak	<i>E12Ω-gfp</i>	AB	2,2 x ↗	2x ↘	Maximova <i>et al.</i> , 2003
<i>Populus</i> (<i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i>) (<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>) scheuten	Rb7 - tabak	<i>35S- gus</i>	AB	10 x ↗	NB	Han <i>et al.</i> , 1997
<i>Populus</i> (<i>P. tremula</i> x <i>P.tremuloides</i>) (<i>P. tremula</i> x <i>P. alba</i>) boom	Rb7 - tabak	<i>35S- gfp</i> <i>RbcS - bar</i>	AB	geen 0,23 ↘	geen geen	Li <i>et al.</i> , 2008

<i>Monocotylen</i>						
<i>O. sativa</i> - plant	Rb7 - tabak	35S- <i>gus</i>	PB	2,5 x ↗	geen	Vain <i>et al.</i> , 1999
	ARS1 - gist	35S- <i>gus</i>	PB	3 x ↗	geen	
<i>O. sativa</i> - plant	Rb7 - tabak	<i>ACT1- gfp</i> (2,3kb tussen promotor en MARS)	PB	18,4 x ↗ (3,3 x ↗)	geen	Cheng <i>et al.</i> , 2001
		<i>ACT1- gus</i> (2,3kb tussen promotor en MARS)		650 x ↗ (376 x ↗)	geen	
<i>O. sativa</i> callus plant: bladeren wortels	TM2 - tabak	35S/ UBI/ PNZIP- <i>gus</i>	AB	3,2/ 4/ 2,3x ↗	geen	Xue <i>et al.</i> , 2005
		35S/ UBI/ PNZIP- <i>gus</i>		5,4/ 9,9/ 4x ↗	geen	
		35S/ UBI/ PNZIP- <i>gus</i>		6,2/ 7,8/ geen x ↗	geen	
<i>O. sativa</i> plant	BP - kip	<i>ACT1/ 35S/ UBI/ RbcS/ Wsi18/ Glb/ Ai- gfp</i>	AB	geen	copynummer afhankelijk	Oh <i>et al.</i> , 2005
<i>Z. mays</i> callus	Adh1 - maïs	<i>Rsyn7-gus</i>	PB	87x	geen	Brouwer <i>et al.</i> , 2002
		35S- <i>luc</i>		26,8x ↗	geen	
	Mha1 - maïs	35S- <i>luc</i>	1,5 x ↗	geen		
	ARS1 - gist	35S- <i>luc</i>	5,8 x ↗	geen		
<i>Z. mays</i> embryogene callus	P - maïs	<i>P1-rr/ WP/ Rsyn7- gus</i>	PB	geen	geen	Sidorenko <i>et al.</i> , 2003
	Adh1 - maïs	<i>P1-rr/ WP/ Rsyn7- gus</i>		geen	geen	
<i>Hordeum vulgare</i> callus	P1 - sojaboon	35S- <i>gus</i>	PB	3,4 x ↗	4,6 x ↘	Petersen <i>et al.</i> , 2002
	TBS - petunia	35S- <i>gus</i>		geen	geen	

Legende: SC= suspensiecellen, *wt*= wild-type, *sgs2*= ‘suppressor of gene silencing 2’ mutant , *sgs3*= ‘suppressor of gene silencing 3’ mutant, P1= MAR uit sojaboon, Gmhsp= MAR uit *Glycine max* hittedschok proteïne, ARS1= MAR uit het ‘autonomously replicating sequence’, B1-X1= MAR uit het *Bam*HI-*Xba*I fragment uit het A element van het kippenlysozym, At= MAR uit *Arabidopsis thaliana*, Rb7= MAR uit een ‘root specific’ promotor, HSC80= MAR uit het *Heat Shock Cognate 80* gen, H9= MAR uit lijn H9 van *N. tabacum*, TM2= MAR uit *N. tabacum*, BP= MAR uit het B1-P1 fragment uit het A element van het kippenlysozym, Adh1= MAR uit een alcoholdehydrogenase van *Z. mays*, Mha1= MAR uit een H⁺-ATPase van *Z. mays*, (vervolg op volgende pagina)

P= MAR uit het *PI-rr* gen, TBS= 'transformation booster sequence'-MAR, NOS= nopalinesynthase promotor, 35S= promotor 35S uit het 'cauliflower mosaic virus' (CaMV), *Lhca3*= promotor van het gen coderend voor het apoproteïne 2 van het 'light harvesting complex' van fotosysteem I uit aardappel, *Enh35S*= 'enhanced' 35S promotor, *AtAhas*= *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase promotor, *GmHspL*= *Glycine max* (sojaboon) 'heat shock protein' 17.6L promotor, *OCS*= octopinesynthase promotor, *APT*= adenine fosforibosyltransferase promotor uit *Arabidopsis*, *MAS*= mannopinesynthase promotor, *E12Q* promotor afgeleid van 35S CaMV, *ACT1*= actine1 promoto uit rijst, *ACT2*= actine2 promotor uit rijst, *CAS*= promotor van het 'cassava vein mosaic virus', *UBI*= ubiquitinepromotor uit maïs, *PNZIP*= fotosynthetische weefsel-specifieke promotor uit *Pharbitis nil*, *RbcS*= promotor uit de kleine subeenheid van Rubisco uit *Arabidopsis*, *Wsi18*= 'stress inducible' promotor uit rijst, *Glb*= globuline promotor uit rijst, *PI-rr*= promotor uit het maïs gen dat codeert voor een molybdeenachtige transcriptionele regulator, *WP*= 'wheat peroxidase' promotor, *Rsyn7*= 'root specific' promotor bestaande uit een synthetische sequentie, *gus*= β -glucuronidase, *luc*= luciferase, *gfp*= 'green fluorescent protein', *bar*= bialofos resistentiegen, *Lc*= *leaf colorless* gen uit maïs, AB= *A. tumefaciens* transformatie, PB= partikelbeschiëting, NB= niet bepaald.

INTERPRETATIE TABEL 1

In een eerste punt worden de data in Tabel 1 geïnterpreteerd. Er wordt stilgestaan bij het verschil in de effecten van MARs tussen dicotyle en monocotyle planten. Algemeen kan gesteld worden dat het niet mogelijk is om eenduidig uit Tabel 1 af te leiden in welke mate MARs de transgenexpressie verhogen en tegelijkertijd de variabiliteit van transgenexpressie verminderen, aangezien er grote verschillen zijn in de proefopzetten: het type plantculturen dat geanalyseerd werd, het precieze ontwerp van de vector, de gebruikte promotors, de reporter genen, de transformatiemethode en de eigenschappen van de specifieke MAR zelf. Deze factoren worden doorheen de interpretatie verduidelijkt. Toch biedt een grondige en gedetailleerde studie van Tabel 1 voldoende materie om vergelijkende conclusies te trekken

Bij de **dicotylen**, meer bepaald *N.tabacum* en *A. thaliana*, kan niet onmiddellijk een algemene trend opgemerkt worden in de effecten van MARs op het niveau van transgenexpressie. In *N. tabacum* werden de effecten van allerlei MARs veelvuldig onderzocht. Hieronder wordt kort ingegaan op de twee meest onderzochte MARs, namelijk een MAR van dierlijke oorsprong (kippenMARs) en een MAR van plantaardige oorsprong (tabMARs).

Ten eerste kan algemeen gesteld worden dat kippen-MARs het niveau van transgenexpressie twee- tot viervoudig verhogen en de variabiliteit ervan twee- tot zevenvoudig verlagen in tabak. Uitsluitend deze MARs en die uit boon veroorzaken in dicotyle planten de effecten die men theoretisch verwacht (van der Geest *et al.*, 1994). Dit gebeurde echter enkel bij gebruik van het reporter gen *gus*. *Luc* bleek namelijk onstabiel te zijn dan *gus*, waardoor de effecten van MARs minder duidelijk zichtbaar waren (Van Leeuwen *et al.*, 2001; Mlynarova *et al.*, 2002). Ten tweede werden tabMARs zelf in tabak onderzocht. Zij konden het niveau van transgenexpressie niet, tweevoudig of 60-voudig verhogen (Allen *et al.*, 1996).

Deze sterke verschillen kunnen te wijten te zijn aan (i) de gebruikte promotors, (ii) het type plantculturen, plant of cel, waarin getest werd en/of (iii) de transformatiemethoden,

partikelbeschiëting of via *A. tumefaciens*. Het effect van 7 promotors (i) op de werking van Rb 7-MARs werd bestudeerd in cellen van *N. tabacum* (Mankin *et al.*, 2003). Bij aanwezigheid van de *ocs* promotor werd een opmerkelijke verhoging in transgenexpressie opgemeten ten opzichte van MAR-transformanten met de *35S*, *AtAhas*, *NOS* en de hiteschok geïnduceerde promotor *GmHspL*. Ook konden MARs een inactieve *ferredoxin* promotor in *N.tabacum* niet aanschakelen (Mankin *et al.*, 2003). In tegenstelling tot Rb7-MARs werden BP-MARs in monocotylen niet beïnvloed door de gebruikte promotor (Oh *et al.*, 2005). Ten tweede werd ook het effect van het type plantculturen (ii) op de werking van Rb7-MARs onderzocht (Allen *et al.*, 1996; Ülker *et al.*, 1999). Zij bleken namelijk bij dicotylen een gunstiger effect te bewerkstelligen in celsuspensies dan in transgene planten. Daarom werd gepostuleerd dat de differentiatiestatus en de proliferatiesnelheid van de cel een invloed kan hebben op het functioneren van MARs. Het bleek echter te eenvoudig te stellen dat de werking van MARs zou verbeteren in cellen die snel delen en zich in een niet-gedifferentieerde toestand bevinden (Ascenzi *et al.*, 2001). Ten derde is algemeen geweten dat de transformatiemethode (iii) ook invloed heeft op de effecten die MARs veroorzaken. Partikelbeschiëting genereert transgene planten met hogere kopij-aantallen dan *A. tumefaciens* transformatie, maar partikelbeschiëting is minder efficiënt. Transgenen met hoge kopij-aantallen worden namelijk meer neerwaarts gereguleerd waardoor hun expressieniveau daalt (Allen, 2008).

In *A. thaliana* bleek de MARs-technologie tot op heden niet succesvol in wild-type planten, in tegenstelling tot *N. tabacum* (Holmes-Davis *et al.*, 2002; De Bolle *et al.*, 2003; De Bolle *et al.*, 2007). Synthetische MARs veroorzaakten echter wel een twee- tot viervoudige verhoging van transgenexpressie in *Arabidopsis* (van der Geest *et al.*, 2004). Er wordt geopperd dat MARs het expressieniveau in zulke sterke mate verhogen dat zij PTGS initiëren en omwille van dit neveneffect negatieve resultaten teweegbrengen voor de optimalisatie van transgenexpressie in *A. thaliana*. In een mutante achtergrond waar PTGS werd uitgeschakeld, kon namelijk wel een verhoging in transgenexpressie waargenomen worden (Butaye *et al.*, 2004).

Bij de **monocotylen** kan wel een algemene trend opgemerkt worden in de effecten van MARs, in tegenstelling tot de onderzochte dicotylen. Uit Tabel 1 blijkt namelijk dat Rb7-, TM2-, Mha1-, P1- en ARS1-MARs het niveau van transgenexpressie 1,5 tot 10-voudig verhogen. Uitschieters zijn de resultaten bekomen in de studie van Cheng *et al.* (2001) en Brouwer *et al.* (2002). In Cheng *et al.* (2001) werd net als in Vain *et al.* (1999) het effect van Rb7-MARs onderzocht in rijstplanten die getransformeerd werden via partikelbeschiëting. In deze studie werd echter een opvallend sterke stijging in het transgenexpressieniveau genoteerd: 18,4 tot 650-voudig. Twee verklaringen worden gegeven voor deze resultaten. Enerzijds verschilde de vector voor transformatie: de actine 1 promotor uit rijst in plaats van een *35S* promotor dreef de expressie aan van het reporter-gen.

Anderzijds verwacht men sterk variërende resultaten bij het gebruik van partikelbeschieting voor transformatie. Bij Cheng *et al.* (2001) was het gemiddelde kopij-aantal van het transgen vier. Bij Vain *et al.* (1999) varieerde dit aantal tussen 24 en 34. Dit laatste argument kan ook een verklaring geven voor een tweede opvallende studie (Brouwer *et al.*, 2002). Het effect van Adh1-MARs uit *Z. mays* werd bestudeerd en er werd een 87-voudige stijging gedetecteerd in het transgenexpressieniveau in maïsplanten. Geen van de beschreven MARs beïnvloedde de variabiliteit van transgenexpressie in monocotylen, behalve P1-MAR uit sojaboon. In *H. vulgare* werd namelijk een bijna 5-voudige daling in variabiliteit gedetecteerd (Petersen *et al.*, 2002). De gunstige effecten van deze MAR op zowel het niveau als de variabiliteit van transgenexpressie komen overeen met de theoretische verwachtingen in verband met de effecten van MARs, net als de kippenMARs in dicotyle planten.

AANVULLINGEN BIJ TABEL 1

In een tweede punt worden de data in Tabel 1 aangevuld om een vollediger beeld te verkrijgen van de effecten die MARs kunnen teweegbrengen. Naast verhogen van het niveau van transgenexpressie en het verlagen van de variabiliteit ervan, werd het effect van MARs regelmatig onderzocht op (i) de stabiliteit van het transgen in verschillende generaties, (ii) de transformatiefrequentie en (iii) het kopij-aantal van het transgen.

(i) Een eerste belangrijk aspect dat moet toegevoegd worden aan deze Tabel is het effect van MARs op de transgenexpressie in de plantgeneraties volgend op de initiële getransformeerde generatie. Ülker *et al.* (1999) toonden aan dat Rb7-MARs uit *N. tabacum* het verlies van transgenexpressie verminderen in de volgende generatie. De transgenexpressie in deze nakomelingen was immers drie maal hoger dan de controles zonder MAR-constructen. Bovendien stelde men vast dat het verlies van transgenexpressie doorheen de generaties te wijten was aan neerwaartse genregulatie. Ook Vain *et al.* (1999) toonden aan dat het expressieniveau tussen de initieel getransformeerde generatie rijstplanten en de eerste generatie nakomelingen niet significant verschilde ten opzichte van elkaar bij gebruik van Rb7-MARs. Deze MARs dragen dus bij tot het behoud van het expressieniveau van een transgen doorheen twee generaties. Deze elementen zouden bescherming kunnen bieden tegen neerwaartse genregulatie in het nakomelingschap van getransformeerde rijstplanten.

(ii) Een tweede aspect dat Tabel 1 aanvult omvat de transformatiefrequentie die positief beïnvloed wordt door MARs. Volgens Petersen *et al.* (2002) en Zhang *et al.* (2007) zijn MAR-elementen in staat de frequentie van transformatie 1,7- tot 2,6-voudig te verhogen. Petersen *et al.*

(2002) transformeerden *H. vulgare* via partikelbeschiëting en de transformatiefrequentie werd tweevoudig verhoogd dankzij de aanwezigheid van zowel sojaboon P1-MARs, als petunia TBS-MARs. Zhang *et al.* (2007) (niet in Tabel 1) bestudeerde het effect van de gencassettes *35S-gus* en *PNZIP-gus* met en zonder TM2 MARs uit *N. tabacum*. Na *Agrobacterium* transformatie van deze plant bleek de transformatiefrequentie ook ongeveer tweevoudig toegenomen bij beide gencassettes door gebruik van de MARs. Naast *N. tabacum* werd *O. sativa* getransformeerd met de constructen *UBI-gus* en *PNZIP-gus* met en zonder TM2- MARs. Ook daar werden gelijkaardige effecten waargenomen (Zhang *et al.*, 2007).

(iii) Het derde aspect dat Tabel 1 aanvult is het effect van MARs op het kopij-aantal van een transgen. Bepaalde MARs zouden een verhoging in transgenexpressie teweegbrengen die afhankelijk is van het kopij-aantal, terwijl andere onafhankelijk daarvan werken. Bij rijstplanten die getransformeerd werden met BP-MARs uit kip steeg de transgenexpressie rechtevenredig met het kopij-aantal verhoogd, terwijl bij de controleplanten geen correlatie opgetekend kon worden (Oh *et al.*, 2005). Ook konden meer transformanten met enkelvoudige kopijen van het gewenste transgen gedetecteerd worden in aanwezigheid van deze MARs. Petersen *et al.* (2002) behaalden gelijkaardige resultaten in de analyses van transgene gerstplanten die sojaboon P1- of petunia TBS-MARs bevatten. Toch kunnen niet alle MARs de transgenexpressie onbeperkt verhogen. In een studie met tabak Rb7-MARs in tabaksplanten steeg de transgenexpressie rechtevenredig met het kopij-aantal tot een grenswaarde van 9 à 10 kopijen van het transgen (Ülker *et al.*, 1999). Dergelijk verband kon niet afgeleid worden uit controleplanten zonder MARs. Men verwacht dat bij deze grenswaarde homologie-afhankelijke ‘silencing’ geïnitieerd wordt. In een studie met zowel tabak Rb7-MARs als gist ARS1-MARs in transgene rijstplanten werd dergelijke correlatie tussen transgenexpressie en het kopij-aantal gedetecteerd voor beide typen MARs tot een grenswaarde van 20 kopijen (Vain *et al.*, 1999). Tenslotte vertonen kippenMARs geen verband tussen het kopij-aantal en transgenexpressie in aanwezigheid van de *35S* promotor, wel bij gebruik van de *Lcha3* promotor in getransformeerde tabaksplanten (Mlynarova, 1994 en 1995).

Concluderend kan men stellen dat dezelfde MARs meerdere effecten kunnen teweegbrengen bij verschillende planten. Onder deze effecten verstaat men (i) het verhogen van het niveau van transgenexpressie, (ii) het verlagen van de variabiliteit in transgenexpressie, (iii) het verhogen van de transformatiefrequentie, (iv) het verhogen van het aantal events met ‘single copy’ inserties in een transgene populatie en (v) het verhogen van de transgenexpressie recht evenredig met het kopij-aantal tot een bepaalde grenswaarde. Effecten (i) en (ii) vinden plaats in zowel de eerste als daaropvolgende plantengeneraties. Bovendien kunnen MAR-elementen al deze effecten met een

sterk verschillende intensiteit veroorzaken, aangezien ze in hun werking ook sterk beïnvloedbaar zijn door een breed scala aan factoren. Op deze manier wordt de interpretatie van de resultaten bij onderzoeken met MARs regelmatig aangevuld door velerlei hypothesen die zelden experimenteel bevestigd werden. De nadruk wordt dus eerder gelegd op het eigenlijke gebruik van MARs zelf, dan op de studie van hun werkingsmechanismen en precieze functies. Ook blijkt de werking van MARs geconserveerd te zijn doorheen het volledige plantenrijk. MARs uit mono- en dicotyle planten kunnen uitgewisseld worden, zelfs MARs uit gist en kip zijn werkzaam in planten. Echter, in de context van de acceptatie van genetisch gemodificeerde planten kan het gebruik van MARs uit niet-plantaardige bronnen een limiterende factor vormen. Algemeen gesteld en bekeken vanuit experimenteel oogpunt verhoogt het merendeel van de MARs het transgenexpressieniveau in planten circa 2 tot 10-voudig en verlagen zij de variabiliteit van transgenexpressie niet, in tegenstelling tot de theoretische verwachtingen. MARs uit kip, sojaboon en boon, die zowel het transgenexpressieniveau als de variabiliteit verbeteren, vormen eerder de uitzondering.

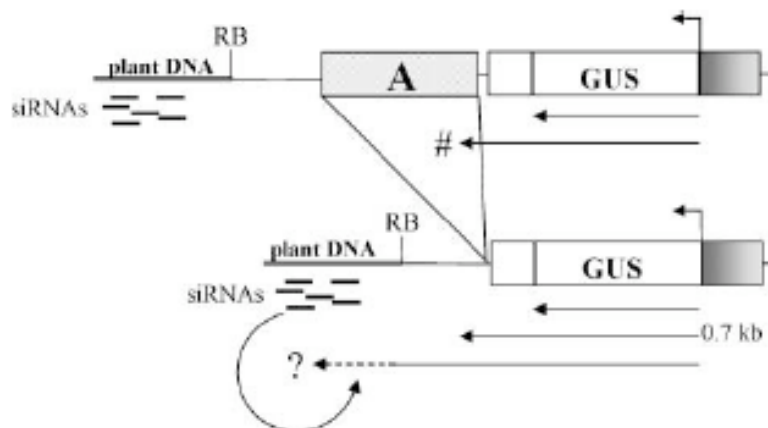
TOEPASSINGEN

Naast de studies in Tabel 1 werden MARs reeds gebruikt voor zeer concrete toepassingen in twee domeinen. Vooreerst werd aangetoond dat ze de performantie van transgene, ziekteresistente planten kunnen verbeteren. In transgene *N. tabacum* flankeerden Rb7-MARs het gen dat codeert voor het nucleocapside van het Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). Door een virusgen tot overexpressie te brengen in een plant wordt bij virusinfectie een vorm van PTGS aangeschakeld die virale genen en hun homologen zal afbreken. Uit testen bleek het aantal TSWV-resistente planten significant groter in de MAR-populatie. Ook behielden 1,5 maal meer MAR-lijnen deze resistentie doorheen vier generaties ten opzichte van de niet-MAR-lijnen (Levin *et al.*, 2005). Door de expressie van cassettes met virale genen te optimaliseren, kunnen MARs een betere neerwaartse genregulatie van vreemd virus-DNA in deze transgene planten verzorgen (Robertson, 2004). Naast virusresistente planten werden ook de performantie van insectresistente transgene planten verbeterd met behulp van MARs. Zo werd suikerriet resistent gemaakt aan de boorkever *Diatraea saccharalis* en de wolluis *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. Uit de resultaten kon opgemaakt worden dat het aantal transgene lijnen met MARs 57% hoger was dan niet-MAR-lijnen (Deng *et al.*, 2008). In een tweede toepassingsdomein werden MARs gebruikt om de overexpressie van allerlei biosynthetische componenten te verbeteren: een stilbeensynthase (Jin *et al.*, 2004), een zetmeelvertakkingsenzym (Kim *et al.*, 2005) en een phytase-enzym (Abranches, 2005b). MARs werden ook ingezet om de productie van polyhydroxyalkanoaten te verhogen in palm (Yunus *et al.*, 2008), de fotorespiratie in chloroplasten te reduceren om de fotosynthese te verbeteren (Niessen *et al.*, 2007), de productie van biomassa te vergroten (Leegood, 2007) en de synthese van

plantdefensines te verhogen (Sels *et al.*, 2007).

1.3.2.4 MARs versus neerwaartse genregulatie

Langs de ene kant verhinderen MARs het optreden van ‘*cis*-silencing’. Dit fenomeen omvat de neerwaartse regulatie van het geïntroduceerd transgen zelf in de plant (Vaucheret, 2006). MAR-elementen verhinderen meer bepaald ‘*cis*-silencing’ veroorzaakt door PTGS. Deze hypothese wordt bevestigd in planten (Mlynarova *et al.*, 2003). Het effect van kippenMARs werd onderzocht op de expressie van *gus* in transgene tabakslijnen. Om deze effecten op welbepaalde plaatsen in het genoom met exact dezelfde chromatinestructuur te bestuderen, maakten zij gebruik van het *Cre-lox*-systeem voor plaats specifieke recombinitie (paragraaf 1.3.1.2). Eerst werd in de lijnen met MARs een duidelijk stabiele *gus*-expressie opgemerkt. Vervolgens werden lijnen zonder MARs geproduceerd door de werking van het Cre recombinase. Deze lijnen vertoonden onderling een beduidend verschillende en lagere *gus*-expressie dan de oorspronkelijke lijnen met MARs. Bovendien werd enkel bij deze lijnen een lager *gusA* mRNA-gehalte gemeten en werd de aanwezigheid siRNA's voor *gusA* gedetecteerd. Men kon dus besluiten dat MARs de transcriptionele doorleesactiviteit verhinderen en instaan voor de bescherming van transgenen tegen ‘*cis*-silencing’ door PTGS (Mlynarova *et al.*, 2003). Deze stelling vormt het meest plausibele model om de werking van MARs te verklaren en wordt geïllustreerd in Figuur 5.



Figuur 5 MARs (A) verhinderen transcriptionele doorleesactiviteit en ‘*cis*-silencing’. De *35S-gus-NOS* cassette is zichtbaar in een stuk van het genoom van tabak. In het bovenste deel van de Figuur wordt het reportergen aan terminatorzijde geflankeerd door een kippenMAR die een fysieke barrière vormt. De aanwezigheid van dit element verhindert daarom doorleesactiviteit. Wanneer het Cre recombinase inwerkt op de *lox*-plaatsen die onmiddellijk rond het MAR-element gelegen zijn, wordt dit element geknipt uit het tabaksgenoom via plaats specifieke recombinitie. In het onderste deel van de Figuur is zichtbaar dat door de afwezigheid van een grenselement de transcriptie van *gus* kan verdergaan tot over andere vectorsequenties en naburig plant-DNA. Deze abnormale transcripten worden omgezet in dsRNA door RNA-afhankelijke RNA-polymerasen en siRNA's worden gevormd. Hiermee is PTGS in gang gezet en treedt neerwaartse genregulatie op (Mlynarova *et al.*, 2003).

Langs de andere kant wordt stellig aangenomen dat MARs geen bescherming bieden tegen ‘*trans-silencing*’ (Allen, 2008). In dit mechanisme veroorzaakt het geïntroduceerd transgen de neerwaartse regulatie van homologe genen die endogeen aanwezig zijn of van homologe transgenen die reeds aanwezig zijn in de plant (Vaucheret, 2006). MAR-elementen zouden noch ‘*trans-silencing*’ veroorzaakt door TGS, noch ‘*trans-silencing*’ veroorzaakt door PTGS verhinderen. Deze hypothese wordt door zowel suggestieve data, als experimenteel bewijs gestaafd (resp. Butaye *et al.*, 2004 en Vaucheret *et al.*, 1998b).

Butaye *et al.* (2004) detecteerden een hogere expressie van transgenen geflankeerd door MARs in *sgs2*- en *sgs3*-mutanten (‘suppressor of gene silencing’) van *A. thaliana*, dan in wild-type planten of mutanten zonder MARs. De *Arabidopsis*-genen *sgs2* en *sgs3* zijn van belang in PTGS en de natuurlijke virusresistentie van planten (Mourrain *et al.*, 2000). Preciezer gesteld codeert *sgs2* voor het RDR6 en dit enzym speelt een belangrijke rol in verschillende PTGS-reactiewegen, waaronder sense-PTGS die bescherming biedt tegen transgenen (paragraaf 1.3.3). *Sgs3* codeert voor een plantspecifiek eiwit dat zou samenwerken met RDR6 (Kumakura *et al.*, 2009). De waarneming dat MARs de transgenexpressie niet verhogen in wild-type *Arabidopsis* planten, maar wel in de beschreven mutanten doet vermoeden dat MARs geen bescherming bieden tegen ‘*trans-silencing*’.

Vaucheret *et al.* (1998b) maakten gebruik van zeer sterke ‘silencing’ loci om het effect van MARs uit kip, boon, gist en tabak te testen op ‘*trans-silencing*’ in transgene tabaksplanten. Enerzijds werd gewerkt met een lijn die een *p35S-RiN* (nitriet reductase in ‘antisense’)-*tNOS* cassette bevatte op één locus. Dit locus kan *in trans* elk ander transgen onder een *35S*-promotor neerwaarts reguleren op transcriptioneel niveau. Anderzijds werd gewerkt met een lijn die op één locus de cassette *p35S-gus-tRbcS* bevatte. Dit locus veroorzaakt op post-transcriptioneel niveau ‘*trans-silencing*’ van alle *gus*-transgenen, ongeacht hun positie in het genoom. Lijnen met deze loci werden gekruist met tabakslijnen getransformeerd met de cassette *p35S-gusA-tNOS* geflankeerd door MARs. Men stelde vast dat alle transgenen in de hybriden neerwaarts gereguleerd werden, ongeacht de aanwezigheid van MAR-elementen. Men kon besluiten dat MARs de neerwaartse genregulatie in sterke ‘*trans-silencing*’ loci niet kunnen verhinderen. Deze bevinding sluit niet uit dat zij wel een effect kunnen uitoefenen op zwakkere ‘*trans-silencing*’ loci. Dit werd tot op heden echter niet experimenteel bevestigd.

Vanuit praktisch oogpunt bieden MARs een groot potentieel in het optimaliseren van transgenexpressie wanneer zij gebruikt worden in samenwerking met bepaalde PTGS-mutanten of suppressors van PTGS (Butaye *et al.*, 2004; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Allen, 2008). Het

synergistisch effect van enerzijds de MARs-technologie om ‘*cis*-silencing’ te reduceren en anderzijds methoden om ‘*trans*-silencing’ te verminderen (Butaye *et al.*, 2004), maken de ‘finetuning’ van transgenexpressie in planten technisch mogelijk.

1.3.3 Focus 2: RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6 (RDR6)

1.3.3.1 Inleiding en eigenschappen

De tweede benadering om transgenexpressie te optimaliseren in deze thesis steunt op het onderdrukken van een aantal PTGS-reactiewegen waarin RDR6 een centrale rol speelt. PTGS wordt beschouwd als een grote hinderpaal in de stabiele expressie van transgenen. Eerder werd immers aangetoond dat *sgs2*-mutanten van *A. thaliana* of *N. tabacum*, waarbij het *rdr6* neerwaarts gereguleerd werd, een geoptimaliseerde transgenexpressie vertoonden (Butaye *et al.*, 2004).

RDR6 behoort tot de familie van de RNA-afhankelijke RNA-polymerasen (RDR’s) waarvan er in planten 6 voorkomen. Deze enzymen gebruiken ssRNA als matrijs om dsRNA te synthetiseren (Czech en Hannon, 2011). RDR’s vormen een klasse van enzymen die deelnemen aan de regulatie van genexpressie op zowel transcriptioneel, als post-transcriptioneel niveau. Ze voeren hun functies uit in het cytoplasma en de celkern (Hollick, 2008; Kumakura *et al.*, 2009). In het algemeen bevatten RDR’s een katalytisch domein dat gekenmerkt wordt door een DLDGD-motief. Dergelijk motief is karakteristiek voor een metaal-chelerende actieve plaats van enzymen. Bovendien werd dit sterk geconserveerd doorheen alle geïdentificeerde RDR’s in zowel dieren, schimmels als planten. Enkel leucine kan variabel zijn (Wassenegger en Krczal, 2006).

Specifiek voor RDR6 kunnen twee activiteiten genoteerd worden: als 3’-nucleotidyltransferase en als primer-onafhankelijk RNA-polymerase. Als nucleotidyltransferase kan het RDR6 één of meerdere nucleotiden aan het 3’-uiteinde van het substraat RNA toevoegen. Als polymerase kan het RDR6 *de novo* RNA synthetiseren met enkelstrenging RNA (ssRNA) of DNA (ssDNA) als matrijs. Het RDR6 kan daarbij echter geen onderscheid maken tussen RNA met of zonder ‘cap’ en RNA met of zonder polyA-staart. Dit betekent dat de herkenning van ‘aberrant’ RNA in samenwerking met andere eiwitten moet gebeuren. ‘Aberrant’ RNA is namelijk een ‘trigger’ voor het aanschakelen van de sense-PTGS-reactieweg die in de volgende paragraaf besproken wordt (Curaba en Chen, 2008). Het gen coderend voor RDR6 wordt in de literatuur ook aangehaald aan de hand van de alternatieve termen ‘silencing-defective gene 1’ (*sde1*) of ‘suppressor of gene silencing 2’ (*sgs-2*) (Wassenegger en Krczal, 2006).

1.3.3.2 Rol in PTGS-reactiewegen en natuurlijke functie

PTGS vervult in alle eukaryoten een rol als een universeel regulatorisch mechanisme. Enerzijds fungeert het als beschermingsmechanisme tegen virussen, transgenen en transposons in het plantengenoom. Anderzijds fungeert het als regulatiemechanisme van genexpressie voor de ontwikkeling van planten en hun respons op stress (Müller, 2010). RDR6 zou, in *A. thaliana* althans, in minimum vier PTGS-reactiewegen een fundamentele rol vervullen (Brodersen en Voinnet, 2006; Curaba en Chen, 2008):

- (i) 'sense' (S)-PTGS reactieweg
- (ii) transitiviteit
- (iii) 'trans-acting' (ta)-siRNA reactieweg
- (iv) 'cis-natural antisense transcript' (nat)-siRNA reactieweg

Deze vier PTGS-reactiewegen spelen in planten een rol gaande van de bescherming tegen transgenen of virussen, exogene signalen, tot de endogene regulatie in de ontwikkeling van planten en hun respons op stress. Naast deze vier PTGS-reactiewegen waarin RDR6 tussenbeide komt, wordt tevens de 'inverted repeat' (IR)-PTGS pathway besproken waar RDR6 geen rol in speelt. In het experimenteel gedeelte van deze thesis wordt namelijk gewerkt met een 'hairpin'-construct en precies dit vormt de 'trigger' voor het aanschakelen van deze reactieweg. De mechanismen van alle aangehaalde PTGS-wegen worden op een vergelijkende manier besproken, ook wordt een blik geworpen op de natuurlijke functies ervan voor de plant.

Een opvallende gelijkensis bij de aangehaalde PTGS-reactiewegen is hun gemeenschappelijk werkingspatroon (Brodersen en Voinnet, 2006):

- (i) de vorming van dsRNA
- (ii) de verwerking tot siRNA's met overhangende uiteinden
- (iii) de inhiberende activiteit van een bepaalde sRNA-streng in een effectorcomplex op gedeeltelijk of volledig complementair RNA of DNA.

Fase (i) kan via verschillende mechanismen gebeuren. Fase (ii) en (iii) kennen echter eenzelfde biochemische kern. siRNA's worden namelijk geproduceerd door Dicers (Brodersen en Voinnet, 2006). Dit zijn RNase III-type enzymen, leden van een familie van ribonucleasen die dsRNA verwerken. Deze enzymen bevatten vier onderscheidbare domeinen met volgende functies: dsRNA-binding, RNA-helicase, RNase III en PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille). Het PAZ-domein interageert met het 3'-uiteinde van sRNA om hiermee base-specifieke contacten te maken (Czech en Hannon, 2011). Vervolgens zal één van de twee siRNA-strengen samenwerken met effectorcomplexen, meer

bepaald ‘RNA-geïnduceerde silencing complexen’ (RISC’s). Deze complexen bevatten een lid uit de eiwitfamilie van de Argonauten (AGO’s) (Brodersen en Voinnet, 2006). Ago’s zijn eukaryote eiwitten die een ssRNase-activiteit uitoefenen en daarin geleid worden door siRNA’s (Hollick, 2008). Op deze manier kan een welbepaald RNA-transcript afgebroken worden.

IR-PTGS VERSUS S-PTGS

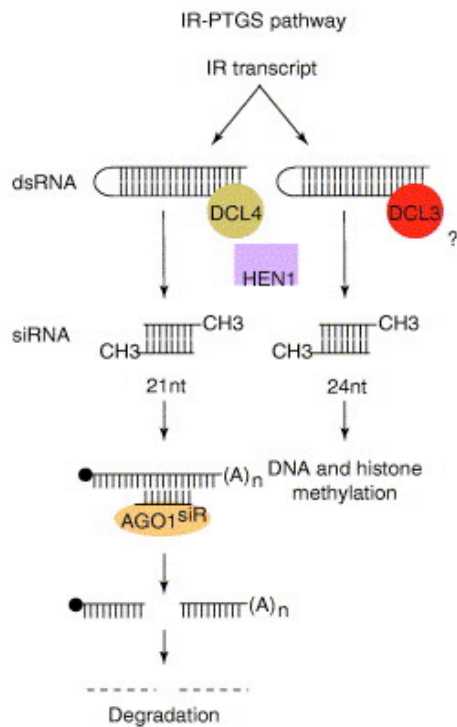
De ‘inverted repeat’ (IR)- en ‘sense’ (S)-PTGS reactiewegen (Figuur 6 resp. A en B) worden beide aangeschakeld door exogene signalen en resulteren in de sequentie-specifieke degradatie van een RNA-transcript (Brodersen en Voinnet, 2006). Onder exogene signalen verstaat men virussen en transgenen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld transposons die endogene signalen vormen (Vaucheret, 2006). Om te beginnen verschilt de initiatie van beide PTGS-reactiewegen: IR-PTGS wordt getriggerd door een omgekeerde herhaling of ‘hairpin’, S-PTGS door ‘aberrant’ RNA. ‘Aberrant’ RNA wordt omschreven als RNA zonder poly(A)-staart of 5’-capping, maar alternatieve ‘triggers’ voor S-PTGS worden niet uitgesloten (Vaucheret, 2006). Gedurende een hoge expressie van ‘sense’ transgenen accumuleert dit RNA tot een bepaalde grenswaarde bereikt wordt (Wassenegger en Krczal, 2006). Bij IR-PTGS wordt het RNA dat afgeschreven werd van het transgen gevouwen in stabiele dsRNA-structuren op basis van intramoleculaire interacties door basecomplementariteit tussen de twee delen van een omgekeerde herhaling. Omwille van dit verschil is IR-PTGS efficiënter dan S-PTGS. Bij S-PTGS komt eerst nog het RDR6 tussenbeide om ‘aberrant’ RNA om te zetten in dsRNA (Vaucheret, 2006, Figuur 6 B). Deze vorming van dsRNA verloopt bovendien in samenwerking met SGS3, al is de functie van dit eiwit nog niet volledig opgehelderd (Brodersen en Voinnet, 2006). Wel werd recent aangetoond dat SGS3 en RDR6 interageren in cytoplasmatische granules, genaamd SGS3/RDR6-lichamen (Kumakura *et al.*, 2009).

Vervolgens konden in IR-PTGS twee Dicer-like (DCL) enzymen gedetecteerd worden nl. DCL4 en DCL3 (Figuur 6 A en B). In S-PTGS werd slecht één DCL gedetecteerd, vermoedelijk is dit DCL4 (Brodersen en Voinnet, 2006). In beide PTGS-biosynthesewegen vindt methylatie plaats van dsRNA door een sRNA-specifiek methyltransferase, HEN1 (HUA enhancer 1) genaamd (Vaucheret, 2006).

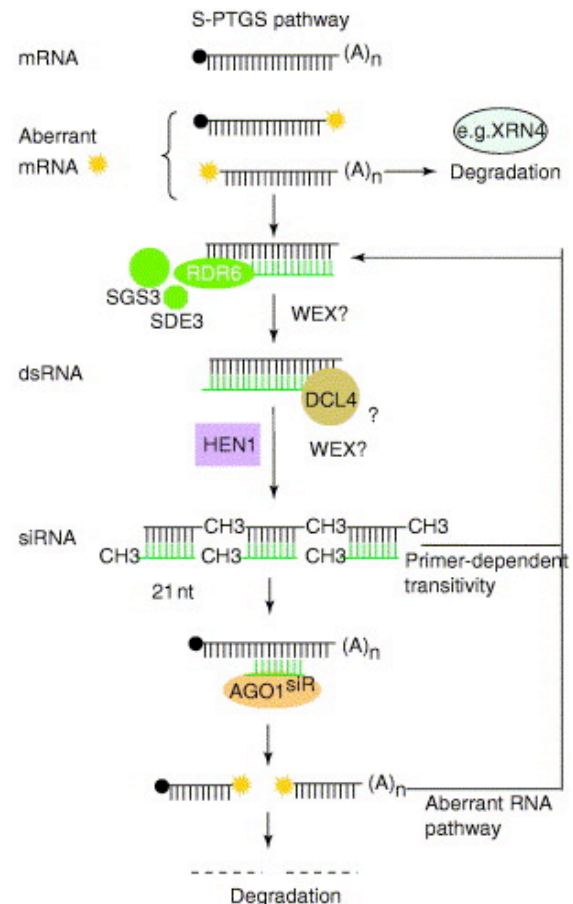
Tenslotte worden bij IR-PTGS twee klassen aan siRNA’s gevormd door DCL4 en DCL3: respectievelijk 21-nt siRNA’s om de splitsing van mRNA te leiden en 24-nt siRNA’s om enkel in chromatinemodificaties tussenbeide te komen. Bij S-PTGS worden enkel 21-nt siRNA’s gevormd (Brodersen en Voinnet, 2006). Bovendien komen bij S-PTGS nog een aantal specifieke componenten ter sprake die in de legende van Figuur 6 A en B verder besproken worden: ‘Werner

exonuclease' (WEX) en 'silencing defective 3' (SDE3) (Vaucheret, 2006). In zowel IR-PTGS als S-PTGS komt AGO1 tussenbeide om in een effectorcomplex ssRNA af te breken na aansturing via complementariteit door siRNAs (Brodersen en Voinnet, 2006).

(A)



(B)



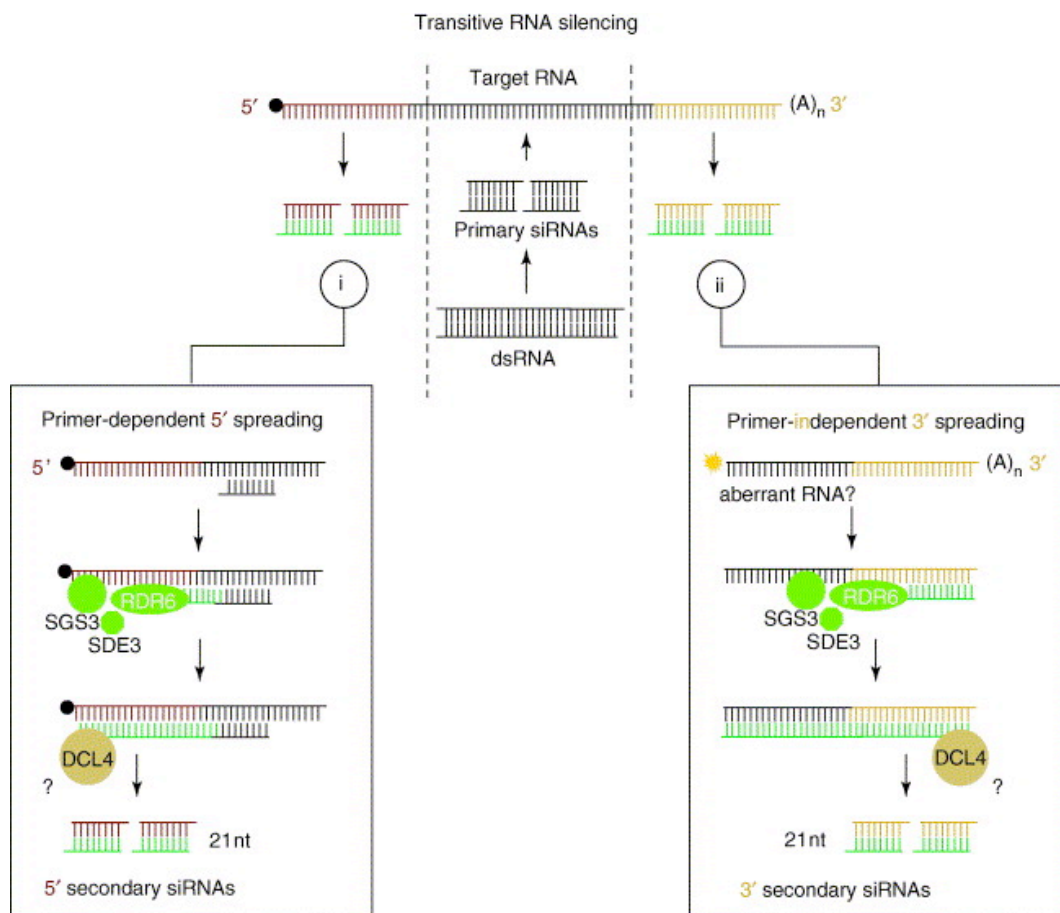
Figuur 6 (A) De IR-PTGS reactieweg. Een omgekeerde herhaling (IR) produceert dubbelstrengige transcripten met perfect complementaire armen. Vervolgens wordt dit transcript verwerkt door twee DCL-enzymen: DCL3 produceert si-RNA's van 24 nt lang en DCL4 produceert siRNAs van 21 nt lang uit het dsRNA. Eén 21 nt siRNA-streng incorporeert in een 'RNA-induced silencing complex' met AGO1 (AGO1-RISC) om de endonucleolytisch klieving van homogeen RNA te leiden. Finaal leidt dit tot de degradatie van het homologe RNA. De 24 nt siRNA's zouden enkel tussenbeide komen in chromatinemodificaties via DNA- en histonmethylatie. Beide klassen van siRNA's ondergaan ook een methylatie aan hun 3' uiteindes door tussenkomst van HEN1 (Brodersen en Voinnet, 2006). IR= 'inverted repeat', dsRNA= dubbelstrengig RNA, DCL= 'Dicer-like'-enzym, HEN1= 'HUA enhancer 1', siRNA= 'small interfering' RNA, nt= nucleotiden, AGO1= 'Argonaute 1' (Brodersen en Voinnet, 2006).

Figuur 6 (B) De S-PTGS reactieweg. Dit mechanisme wordt aangeschakeld door 'aberrant' RNA. 'Aberrant' RNA wordt gekenmerkt door de afwezigheid van een poly(A)-staart of de afwezigheid van 5' 'caps'. Deze laatstgenoemde afwijking leidt normaal tot de degradatie van RNA door het exonuclease XRN4. De afwezigheid van dit exonuclease zou de accumulatie van mRNA zonder 'caps' stimuleren. De conversie van het transcript in dsRNA wordt bewerkstelligd door de samenwerking van het RDR6, het RNA helicase SDE3, SGS3 en mogelijk een RNaseD exonuclease WEX (Vaucheret, 2006). Het resulterende dsRNA wordt dan verwerkt door vermoedelijk DCL4 en er worden si-RNA's van 21 nt lang gevormd. Deze siRNA's worden gemethyleerd door HEN1. Vervolgens kunnen deze moleculen twee reacties ondergaan. Ten eerste kunnen ze gebruikt worden als primers door het RDR6 om de dsRNA-productie van enkelstrengige matrijzen te versterken. Dit fenomeen heet transitiviteit en wordt gevisualiseerd in Figuur 7. Ten tweede kunnen de gemethyleerde siRNA's ook incorporeren in het effectorcomplex 'Argonaute 1' - 'RNA induced silencing complex' (AGO1-RISC). Op deze manier wordt dit complex geleid naar de

sequentie-specifieke afbraak van homologe RNA. De resulterende degradatieproducten kunnen op hun beurt ook beschouwd worden als ‘aberrant’ RNA en de productie van dsRNA meer stimuleren, waardoor een amplificatie van de reactie ontstaat (Brodersen en Voinnet, 2006). S= ‘sense’, RDR6= RNA-afhankelijk polymerase 6, SDE3= ‘silencing defective 3’, SGS3= ‘suppressor of gene silencing 3’, WEX= ‘Werner exonuclease’, dsRNA= dubbelstrengig RNA, DCL= ‘Dicer-like’-enzym, HEN1= ‘HUA enhancer 1’, siRNA= ‘small interfering’ RNA, nt= nucleotiden, AGO1= ‘Argonaute 1’ (Brodersen en Voinnet, 2006).

TRANSITIVITEIT

Transitiviteit (Figuur 7) kan gedefinieerd worden als de ‘transitie’ van primaire siRNA’s naar secundaire siRNA’s buiten het initiële interval van PTGS. siRNA’s kunnen dus ook geproduceerd worden buiten de initiële doelwitregio van PTGS (Wassenegger en Krczal, 2006). Hierdoor zal een sterkere neerwaartse genregulatie van het originele doelwittranscript optreden. De verspreiding van het PTGS-sigitaal in 5’ richting gebeurt primerafhankelijk. Primaire siRNA’s fungeren daarbij als primer voor het RDR6. De verspreiding van het PTGS-sigitaal in 3’ richting gebeurt daarentegen primeronafhankelijk. Nadat primaire siRNA’s de afbraak van een transcript gemedieerd hebben, kunnen de afgebroken RNA-fragmenten herkend worden als ‘aberrant’ en S-PTGS initiëren. Op deze manier worden secundaire siRNA’s gevormd door tussenkomst van volgende componenten die ook in S-PTGS een rol spelen: SGS3, SDE3, RDR6, en DCL4. (Brodersen en Voinnet, 2006).



Figuur 7 Transitiviteit. In transitieve PTGS promoot een dsRNA-bron van primaire si-RNA’s de productie van secundaire siRNA’s in zowel 5’ als 3’ richting. De productie van 5’ secundaire siRNA’s kan verklaard worden door een RDR6/SGS3/SDE3-afhankelijke synthese van een complementaire streng met één van de

primaire siRNA's als primer. De productie van 3' secundaire siRNA's kan niet verklaard worden door een reactie die met behulp van een primer verloopt. Het is mogelijk dat RNA-fragmenten, afkomstig van de klieving van primaire transcripten geleid door siRNA, herkend worden als 'aberrant'. Daardoor kan een dsRNA-synthese zoals in S-PTGS geïnitieerd worden. DCL4 is mogelijk betrokken in de biogenese van siRNA's in 5' en 3' richting. Er worden dan secundaire siRNA's gevormd die 21 nt lang zijn (Brodersen en Voinnet, 2006). S= 'sense', RDR6= RNA-afhankelijk polymerase 6, SDE3= 'silencing defective 3', SGS3= 'suppressor of gene silencing 3', dsRNA= dubbelstrengig RNA, DCL= 'Dicer-like'-enzym, siRNA= 'small interfering' RNA, nt= nucleotiden.

Efficiënte PTGS vereist naast een initiatiefase, ook een fase waarin neerwaartse genregulatie behouden wordt om verdedigingsreacties in de plant te kunnen behouden. Transitiviteit is het mechanisme dat instaat voor dit behoud. Er vindt namelijk een verspreiding plaats van het PTGS-sigitaal naar naburige cellen en vervolgens verder gelegen cellen, zowel in 5' als 3' richting. Het betreft een systemische aard van de verdedigingsrespons van planten voor anti-virale defensie (Brodersen en Voinnet, 2006). De verspreiding van PTGS kan van cel tot cel plaatsvinden doorheen plasmodesmata naar naburige 'siRNA receptorcellen' waarin homologe RNA afgebroken wordt. Ook kan deze verspreiding over lange afstanden plaatsvinden, al zouden de siRNA's dan wel doorheen het vasculair systeem van de plant verplaatst worden (Wassenegger en Krczal, 2006).

TA-SIRNA VERSUS NAT-SIRNA

De 'trans-acting' (ta)- en 'cis-natural antisense transcript' (nat)-siRNA reactiewegen worden beide aangeschakeld door endogene signalen, in tegenstelling tot IR- en S-PTGS (Brodersen en Voinnet, 2006). De ta-siRNA reactieweg is van belang in de natuurlijke plantontwikkeling (Peragine *et al.*, 2004), terwijl de nat-siRNA reactieweg een fundamentele rol zou spelen in de genregulatie van planten (Brodersen en Voinnet, 2006). RDR6 speelt ook in deze twee reactiewegen een rol, maar dit wordt niet diepgaander besproken, aangezien deze reactiewegen niet direct verband houden met neerwaartse genregulatie van transgenen.

Aangezien het RDR6 een rol speelt in alle bovenvermelde reactiewegen, kan men ervan uitgaan dat het reduceren van de functie van RDR6 fundamentele wijzigingen kan aanbrengen in het functioneren van een plant. Via deze benadering zou de transgenexpressie in theorie verhoogd kunnen worden, maar andere fundamentele plantprocessen worden op een tegennatuurlijk manier beïnvloed die nefaste gevolgen kan hebben voor de plant zelf. Daardoor zal de toepasbaarheid voor transgene plantproductie waarschijnlijk beperkt blijven tot gecontroleerde omstandigheden.

1.4 Algemene en specifieke doelstelling van deze thesis

De algemene doelstelling van deze thesis wordt omschreven als de optimalisatie van transgenexpressie met behulp van MARs in de cultivar ‘Williams’ uit de triploïde Cavendish groep (AAA) van banaan (*Musa spp.*). Meer specifiek zal deze optimalisatie uiteenvallen in volgende twee doelstellingen:

- (i) het verhogen van het niveau van transgenexpressie
- (ii) het reduceren van de variabiliteit van transgenexpressie

- Het **niveau** van transgenexpressie wordt in deze thesis gedefinieerd als de gemiddelde GUS-activiteit in de populatie MAR-transformanten ten opzichte van niet-MAR-transformanten.
- De **variabiliteit** van transgenexpressie wordt in deze thesis gedefinieerd als de variantie van de GUS-activiteit in de populatie MAR-transformanten ten opzichte van niet-MAR-transformanten.

Deze definities worden hier expliciet vermeld, aangezien de definitie voor de variabiliteit van transgenexpressie kan variëren in de literatuur.

2. Materialen en methoden

2.1 Aanmaak van vectoren

2.1.1 Antibioticum stockoplossingen en media

In Tabel 2 worden de gebruikte antibioticum stockoplossingen beschreven voor zowel *E. coli* als *A. tumefaciens*. De stocks werden bereid met milliQ water en gefiltersteriliseerd, nadien werden ze bewaard bij -20°C. Bij gebruik werd steeds met een verdunning van 1000x gewerkt, na toevoeging aan een geautoclaveerd medium.

Tabel 2 Antibioticum stockoplossingen voor *E. coli* en *A. tumefaciens*.

Antibioticum	Concentratie (mg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Streptomycine (Sm)	20	100
Spectinomycine (Sp)	50	300
Kanamycine (Km)	50	NVT
Ampicilline (Ap)	100	NVT*

*niet van toepassing

In Tabel 3 wordt de bereiding van het ‘Luria-Bertani’ of ‘L-Broth’ (LB) medium beschreven voor het opgroeien van bacteriekolonies van *E. coli* of *A. tumefaciens*. Het ‘Yeast Extract Peptone’ (YEP) medium werd enkel gebruikt voor *A. tumefaciens*. Het vast medium bevatte agar, het vloeibaar medium bevatte geen agar. Bij bereiding werden de vaste componenten aangelengd met demi-water tot het gewenst volume. Nadien werd het geheel geautoclaveerd.

Tabel 3 Samenstelling van LB-medium voor het opgroeien van bacteriekolonies van *E. coli* en *A. tumefaciens* en YEP-medium voor *A. tumefaciens*.

Component	Concentratie (g/l)	
	LB	YEP
Bacto pepton	/	10
Bacto trypton	10	/
Bacto gistextract	5	10
NaCl	10	5
Bacteriologische Agar	15	15

2.1.2 DNA-manipulaties in *E. coli* en *A. tumefaciens*

2.1.2.1 Plasmide-isolatie

Een *E. coli* bacteriekolonie werd aangeënt in 5 ml vloeibaar LB-medium met de gepaste antibiotica. Dit werd overnacht op 37°C geplaatst in een schudincubator aan 200 rpm. Een *A. tumefaciens* bacteriekolonie werd aangeënt in 25 ml vloeibaar YEP-medium met de gepaste antibiotica. Dit werd 24 u op 28°C geplaatst in een schudincubator aan 120 rpm. Zowel de QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®), als de Invisorb® Spin Plasmid Mini Two kit (Invitek, Westburg) werden gebruikt om het plasmide-DNA uit de opgegroeide cellen op te zuiveren. De geïsoleerde plasmiden werden bewaard bij -20°C. Voor het protocol wordt verwezen naar de handleiding in beide kits. Er werden enkele aanpassingen doorgevoerd:

- *A. tumefaciens*:

- 4,5 ml cultuur werd centrifugeerd op 4000 rpm gedurende 5 min
- de pellet werd geresuspendeerd in 375 µl buffer P1
- 375 µl buffer P2 werd gebruikt
- 525 µl buffer N3 werd gebruikt
- het DNA werd finaal geëluëerd in 50 µl EB (voorverwarmd op 70°C), geïncubeerd op kamertemperatuur gedurende 5 min, afgecentrifugeerd op 13000 rpm gedurende 1 min en dit werd herhaald met 30 µl EB (voorverwarmd op 70°C).

2.1.2.2 Bepaling van DNA-concentratie en zuiverheid

De concentratie (ng/µl) en de zuiverheid van het opgezuiverde plasmide-DNA van *E. coli* en *A. tumefaciens* werd gemeten met behulp van de Nanodrop®ND-1000 UV-VIS spectrofotometer (NanoDrop Technologies Inc, USA). Twee µl van de EB-buffer als blanco en 2 µl van het staal werden gebruikt voor deze analyse. Een absorptie bij een golflengte van 260 nm (A_{260}) van 1,0 vertaalt zich in ongeveer 50 µg/ml DNA. Bij 260 nm absorberen nucleotiden, ssDNA, dsDNA en RNA. De verhouding van de absorpties bij 260 en 280 nm (A_{260}/A_{280}) en bij 260 en 230 nm (A_{260}/A_{230}) zijn maatstaven voor de zuiverheid van het DNA. Zij dienen zich resp. rond 1,8 en 2 te bevinden voor DNA. Wanneer de eerste verhouding lager is dan de streefwaarden kan dit het gevolg zijn van contaminaties van proteïnen, fenol of andere moleculen die bij 280 nm sterk absorberen. Wanneer de tweede verhouding lager is dan de streefwaarden kan dit het gevolg zijn van contaminaties van EDTA, koolhydraten, fenolen of andere moleculen die bij 230 nm sterk absorberen (NanoDrop Technologies Inc, 2007).

2.1.2.3 Restrictiedigest

Een ‘restrictiedigest’ werd uitgevoerd op plasmide-DNA, omwille van twee redenen:

- (i) componenten uit een vector knippen voor het kloneringswerk
- (ii) verifiëren of een aangemaakte vector correct was

De verhoudingen van de benodigde componenten in het reactiemengsel voor de ‘restrictiedigest’ worden weergegeven in Tabel 4. De gebruikte restrictie-enzymen (New England Biolabs, NEB) worden weergegeven in Tabel 5.

Tabel 4 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de ‘restrictiedigest’

Component	Plasmide uit <i>E. coli</i>	Plasmide uit <i>A. tumefaciens</i>
Plasmide	3 µg (i) of 1µg (ii)	0,5 µg
Restrictie-enzym (10 000-20 000 U/ml, NEB)	1 µl	0,5 µl
Buffer (10x)	3 µl (i) of 2 µl (ii)	6 µl
Bovine Serum Albumine (BSA) (100x, NEB)	0,3 µl (i) of 0,2 µl (ii)	0,6 µl
MilliQ water	aangelengd tot 30 µl (i) of 20 µl (ii)	aangelengd tot 60 µl

‘restrictiedigest’ om (i) componenten uit een vector te knippen voor het kloneringswerk
(ii) verifiëren of een aangemaakte vector correct was

De buffer (NEB) waarin elke restrictie-enzym met de hoogste activiteit kan werken, is te vinden op http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/buffer_activity_restriction_enzymes.asp. BSA is slechts bij een aantal restrictie-enzymen nodig.

Tabel 5 Overzicht van de gebruikte restrictie-enzymen in het kloneringswerk en de bijhorende reactiecondities.

Naam restrictie-enzym	Buffer met 100% activiteit	Duur reactie (min), temperatuur (°C)	Duur inactivatie (min), temperatuur (°C)
PI- <i>PspI</i>	PI- <i>PspI</i> buffer + BSA	60, 65	/
<i>AscI</i>	4	60 - 120, 37	20, 65
<i>SacI</i>	1 + BSA	60 - 120, 37	20, 65
<i>HindIII</i>	2	60 - 120, 37	20, 65
<i>NcoI</i>	3	60 - 120, 37	20, 65
<i>SacII</i>	4	60 - 120, 37	20, 65
<i>BamHI</i>	3 + BSA	60 - 120, 37	20, 65
<i>FseI</i>	4 + BSA	60 - 120, 37	20, 65
<i>XhoI</i>	4 + BSA	60 - 120, 37	20, 65

2.1.2.4 Partiële restrictiedigest

- Eerst werd de ‘restrictiedigest’ met het eerste enzym uitgevoerd: 10 µl plasmide-DNA (ca. 3 µg), 7 µl milliQ water, 2 µl 10x restrictiebuffer en 1µl (5 - 20 U) restrictie-enzym. Dit mengsel werd geïncubeerd volgens de duur en de temperatuur die het enzym behoefde.
- Dan werden 72 µl milliQ water en 8 µl 10x restrictiebuffer voor het tweede enzym toegevoegd om een totaalvolume van 100 µl te bekomen. Dit staal werd A genoemd en op ijs geplaatst.
- Uit A werd telkens 20 µl gealiquoteerd in epjes B, C, D en 10 µl uit A werd gealiquoteerd in epje E op ijs.
- Van het tweede restrictie-enzym werd 1 µl aan epje A (met de resterende 30 µl van het eerste restrictiemengsel) toegevoegd en goed gemengd.
- Telkens werd 10 µl van A naar B, van B naar C, van C naar D en van D naar E overgepipetteerd om een seriële verdunning te maken. Telkens werd goed gemengd en van pipetpunt veranderd.
- Alle epjes werden geïncubeerd volgens de temperatuur die het tweede enzym behoefde gedurende 3 min. Nadien werden de epjes op ijs geplaatst.
- 100 µl van buffer PB (Qiaquick PCR Purification Kit, QIAGEN®) werd toegevoegd aan elk epje en de stalen werden gepoold in één epje.
- Het gepoolde staal werd op een Qiaquick-kolom overgebracht en gecentrifugeerd op 13 000 g gedurende 1 min. De doorloop werd weggegoten.

- 750 µl buffer PE werd toegevoegd en alles werd gecentrifugeerd op 13 000 g gedurende 1 min. De doorloop werd weggegoten.
- De kolom werd gedroogd door een centrifugatiestap gedurende 2 min op 13 000 g. Vervolgens werd de kolom overgezet in een epje en werd 30 µl EB buffer toegevoegd. Dit werd 1 min op kamertemperatuur geïncubeerd en gedurende 1 min op 13 000 g gecentrifugeerd. De kolom werd verwijderd.
- De restrictieproducten werden op een agarosegel van 0,7% geplaatst. De elektroforese verliep bij 90 V en gedurende minstens 2 u (2.1.2.6).

2.1.2.5 Plasmide-PCR

De plasmide-PCR ('Polymerase Chain Reaction') werd uitgevoerd op opgezuiverd plasmide-DNA met twee mogelijke doelen:

(i) voor plasmide opgezuiverd uit *E. coli*: het vermenigvuldigen van bepaalde DNA-sequenties voor het kloneringswerk;

(ii) voor plasmide opgezuiverd uit *A. tumefaciens*: het verifiëren van aanwezigheid van correcte vectoren als voorbereiding van de banaantransformatie.

In Tabel 6 worden de verhoudingen van de nodige componenten voor de PCR-reactie weergegeven.

In Tabel 7 wordt een overzicht van de gebruikte primers weergegeven.

Tabel 6 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de plasmide-PCR-reactie.

Component	Plasmide uit <i>E. coli</i>	Plasmide uit <i>A. tumefaciens</i>
plasmide-DNA	2 µl (100 ng/µl)	0,5 µl (100 ng/µl)
- Phusion® DNA polymerase High Fidelity (0,02 U/µl, NEB) (i)	0,5 µl (i)	0,5 µl (ii)
- <i>Taq</i> DNA polymerase (0,5 U/µl, NEB) (ii)		
- High Fidelity Phusion buffer (5x) (i)	10 µl (i)	2 µl (ii)
- Thermo Polymerase buffer (10x) (ii)		
dNTP's (2mM, Invitrogen)	5 µl	2 µl
Forward primer (10 µM, Integrated DNA Technologies)	2,5 µl	2,5 µl
Reverse primer (10 µM, Integrated DNA Technologies)	1 µl	1 µl
MilliQ water	aangelengd tot 50 µl	aangelengd tot 20 µl

Plasmide-PCR voor (i) plasmide opgezuiverd uit *E. coli* en (ii) plasmide opgezuiverd uit *A. tumefaciens*.

Tabel 7 Overzicht van de gebruikte primers voor plasmide-PCR.

Naam primer	Sequentie 5' → 3'	Doelwitsequentie
PFI5114 F	CGTAAGAGCTCGATCCCCAGCTGCAT	p <i>UBI-gusA-intron</i> uit pETKUL19 met <i>SacI</i> -knipplaatsen aan de uiteindes
PFI5115 R	CGATCGAGCTCTCACACGTGGTGGTG	
PFI5015 F	GGCCGGCCTTGGAAGGCTTTATCGTTCA	kort fragment voor <i>rdr6</i> -‘hairpin’ uit pCMVFL3 met overhangende uiteindes met <i>FseI</i> -knipplaats
PFI5048 R	CTCGAGGCGCGTCGTATGAACACTT	kort fragment voor <i>rdr6</i> -‘hairpin’ uit pCMVFL3 met overhangende uiteindes met <i>XhoI</i> -knipplaats
PFI5276 F	TACCAGTTTAAACTTGGAAGGCTTTATC GTTCA	lang fragment voor <i>rdr6</i> -‘hairpin’ uit pCMVFL3 met overhangende uiteindes met <i>PmeI</i> -knipplaats
PFI5014 R	CTCGAGAAGCTAAGGCTTGCCGGTAT	lang fragment voor <i>rdr6</i> -‘hairpin’ uit pCMVFL3 met overhangende uiteindes met <i>XhoI</i> -knipplaats
OWB425 R	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	verificatie van de aanwezigheid van pCMPG7388, pCMPG7387, pCMPG7404 of pCMPG7403 in de supervirulente <i>A. tumefaciens</i> -stam EHA101
OWB426 F	GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA	

F = forward, R = reverse primer, de herkenningsplaatsen van restrictie-enzymen in de primers werden onderlijnd

Het gebruikte protocol van de plasmide-PCR in het toestel C1000 Thermal Cycler (BIORAD®):

1. Initiële denaturatie: 95°C; 5 min
2. Denaturatie: 95°C; 15 s
3. Aanhechting van de primers: temperatuur afhankelijk van de smelttemperatuur van het primerpaar - 2 à 5°C; 30 s
4. Elongatie: 72°C; duur afhankelijk van de lengte van het te amplificeren fragment (1000 bp/min)
5. Herhaling: de stappen 2 tot en met 4 worden 34 keer herhaald

6. Finale elongatie: 72°C; 10 min
7. Bewaring in het toestel: 10°C, onbeperkte duur

Dit protocol geldt voor het *Taq* polymerase, het Phusion® polymerase vereist een initiële denaturatie van 3 min op 98°C en een denaturatie van 30 s op 98°C.

2.1.2.6 Agarosegelelektroforese

Een agarose gelelektroforese werd gebruikt om producten uit de (partiële) ‘restrictiedigests’ en PCR-reacties te visualiseren en/of verder te gebruiken voor het kloneringswerk. Voor het eerste doel werd 1 µg DNA op gel geladen, voor het tweede doel werd 3 µg DNA op gel geladen. Ook werd telkens 5 µl *DNA-ladder* (Smartladder®, 1kb, Eurogentec) geladen.

Benodigheden voor het maken van de gel en de elektroforese:

- UltraPure™ Agarose (Invitrogen): de concentratie is afhankelijk van de grootte van de te scheiden DNA-fragmenten en varieerde tussen 0,8% en 1,5%.
- TBE-buffer (1X) [Tris-boraat-EDTA; 1 l 10x: 108 g Tris (tris(hydroxymethyl)-aminomethaan), 55 g boorzuur en 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8]: om de agarose op te lossen.
- De oplossing werd gekookt in een erlenmeyer in een microgolfoven, afgekoeld en uitgegoten in het daarvoor bestemde reservoir (BIORAD®). Hierbij werd 0,1 µg/ml ethidiumbromide (Amresco) toegevoegd en gemengd met pipetpunt om het gemigreerde DNA te visualiseren onder de UV-licht.
- Kammen werden aangebracht en nadat de gel volledig gestold was (+/- 20 min), werden de kammen verwijderd.
- Het reservoir met de gel werd in de elektroforese-tank geplaatst, die gevuld was met dezelfde TBE-buffer.
- De te analyseren stalen werden eerst aangelengd met milliQ tot 20 µl en vervolgens werd 5 µl laadbuffer [blue juice; 6x TBE-buffer, 30% (v/v) glycerol, 0,25% (v/v) bromofenolblauw, 0,25% (v/v) xyleencyanol] toegevoegd.
- Na het laden van de stalen op gel werd de elektroforese gestart met een spanningsverschil van 120 V en een stroom van 500 mA gedurende 1 u. Nadien kon het resultaat van de gelelektroforese op foto vastgelegd worden tijdens UV-belichting (320 nm).

2.1.2.7 DNA-opzuivering uit agarosegel

Om DNA-fragmenten te isoleren uit een agarosegel werd de QIA quick® Gel Extraction Kit (QIAGEN®) gebruikt. Voor het exacte protocol wordt verwezen naar de handleiding bij deze kit.

2.1.2.8 Defosforylatie

Tabel 8 geeft de verhoudingen van de componenten weer die gebruikt werden in een defosforylatiereactie. Het fosfatase katalyseert het verwijderen van de 5'-fosfaatgroepen van het DNA, zodat geknipt DNA niet kan zelf-ligeren. De reactie gebeurde gedurende 1u op 37°C en de inactivatie gebeurde gedurende 5 min op 65°C.

Tabel 8 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de defosforylatiereactie.

Component	Volume (µl)
Geknipt plasmide-DNA en geëxtraheerd uit gel	25
Antarctic Phosphatase (1000U, 5000 U/ml, NEB)	2
Antarctic Phosphatase reactiebuffer (10x) (NEB)	3

2.1.2.9 Ligatie

Bij het kloneringswerk werd een gewenst insert geligeerd in een gedefosforyleerde vector aan de hand van volgende verhoudingen die gebaseerd zijn op molaire ratio 3:1 (insert:vector) :

$$\text{- } \mu\text{g DNA van het insert} = 90 \text{ fmols} \times \frac{1 \mu\text{g}}{3000 \text{ fmols}} \times \frac{\text{grootte insert (bp)}}{1000 \text{ bp}}$$

$$\text{- } \mu\text{g DNA van de vector} = 30 \text{ fmols} \times \frac{1 \mu\text{g}}{3000 \text{ fmols}} \times \frac{\text{grootte vector (bp)}}{1000 \text{ bp}}$$

Het ligase-enzym katalyseert de vorming van een fosfodi-esterbinding tussen een naburige 5'-fosfaatgroep en een 3'-hydroxylgroep in duplex DNA. Indien de ligatie niet succesvol was, werd geëxperimenteerd met molaire ratio's 1:1 en 5:1. De ligatiereactie vond plaats gedurende 1 u op 25°C of overnacht op 16°C. In Tabel 9 worden de verhoudingen van de andere nodige componenten, naast het insert en de vector, weergegeven.

Tabel 9 Verhoudingen van de componenten, naast insert en vector, in het reactiemengsel voor de ligatiereactie.

Component	Volume (μ l)
T4 DNA-ligase (100 U, Invitrogen)	1
T4 DNA-ligase buffer (4x) (Invitrogen)	2
MilliQ water	aangelengd tot 20

2.1.2.10 TOPO TA-klonering

De TOPO-klonering is een methode om PCR-amplificatieproducten eenvoudig in een plasmide te kloneren. Het is gebaseerd op de basencomplementariteit tussen A-overhangende uiteindes van het PCR-product en T-overhangende uiteindes van de TOPO-vector. Deze A-overhangende uiteindes worden gevormd bij amplificatie door een standaard *Taq*-polymerase. Er werd gebruik gemaakt van volgende kit: TA Cloning® Kit with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Voor het protocol van de TOPO TA-klonering wordt verwezen naar de handleiding TA cloning® Kit, Invitrogen Corporation, versie V 2004.

2.1.2.11 Transformatie van chemisch competente cellen

In eerste instantie werden nieuw aangemaakte vectoren getransformeerd naar competente *E. coli*-cellen, meerbepaald TOP10 cellen ®, door middel van een hitteschok. Er werd gebruik gemaakt van de One Shot® competent cell kit (Invitrogen). Voor het protocol van de transformatie wordt verwezen naar

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/cloning/competent-cells-protocol/routine-cloning-using-top10-competent-cells.html>> ‘Chemical Transformation Procedure’.

Er werden enkele aanpassingen doorgevoerd:

- LB in plaats van SOC werd gebruikt.
- 50 μ l en 200 μ l werd van het transformatiemengsel uitgeplaat op LB-platen met een selectief antibioticum. Deze platen werden overnacht geïncubeerd op 37°C. Vervolgens werd geverifieerd of de opgegroeide kolonies de correcte vectoren bevatten. Dit gebeurde volgens 4 methodes: kolonie-PCR, ‘restrictiedigest’, sequentiebepaling en een extra ‘restrictiedigest’.

In tweede instantie werden chemisch competente *A. tumefaciens*-cellen ook getransformeerd door middel van volgend protocol :

- Plasmide-DNA (minder dan 1 μg , minder dan 10 μl) werd snel toegevoegd aan een bevroren flacon (-80°C) met 100 μl met chemische competente *A. tumefaciens*-cellen op vloeibare N_2 .
- De flacon werd gedurende 1 min op 37°C geïncubeerd, even geschud en verder geïncubeerd gedurende 4 min op 37°C .
- 1 ml LB werd toegevoegd en de flacon werd gedurende 2 à 4 u bij 28°C geïncubeerd in een schudincubator aan 200 rpm.
- De flacon werd gecentrifugeerd gedurende 10 min bij 4000 rpm. Een volume van 900 μl werd uit de flacon genomen en de pellet werd geresuspendeerd in het overblijvende volume.
- 50 μl van het mengsel werd uitgeplaat op LB-platen met een selectief antibioticum. Deze platen werden gedurende 2 dagen geïncubeerd op 28°C . Achteraf kon geverifieerd worden of de opgegroeide kolonies de correcte vectoren bevatten. Dit gebeurde volgens twee methodes: plasmide-PCR en ‘restrictiedigest’.

2.1.2.12 Kolonie-PCR

Kolonie-PCR werd gehanteerd als een eerste verificatiemethode om te bevestigen of de opgegroeide kolonies de correcte, nieuw aangemaakte vector bevatten. Met een pipetpunt werd de kolonie opgepikt, een streepenting werd gemaakt op selectieve LB-platen en hetgeen overbleef aan de pipetpunt werd opgelost in 40 μl milliQ water. In Tabel 10 worden de nodige verhoudingen van componenten voor de PCR-reactie weergegeven, voor gedetailleerde technische informatie wordt verwezen naar Tabel 6. In Tabel 11 worden de gebruikte primers voor de kolonie-PCR’s opgesomd. Voor het protocol van de kolonie-PCR wordt verwezen naar de plasmide-PCR.

Tabel 10 Verhoudingen van de componenten in het reactiemengsel voor de kolonie-PCR-reactie.

Component	Volume (μl)
DNA (5 min bij 95°C)	10
<i>Taq</i> DNA polymerase	0,2
Thermo Polymerase buffer (10x)	2
dNTP’s (2mM)	2
Forward primer (10 μM)	1
Reverse primer (10 μM)	1
MilliQ water	aangelengd tot 20

Tabel 11 Overzicht van de gebruikte primers voor kolonie-PCR.

Naam primer	Sequentie 5' → 3'	Doel
OWB 348 R	GATCGTTCAAACATTTGGC	{ verificatie VpPZP200ML-pFAJ3411
OWB 417 F	CCTAGGAGTATCACGGCTAAT	
PFI3620	CACCATGTTACGTCCTGTAGAAACC	{ verificatie VpFAJ3223-pFAJ3411
PFI3621	TCATTGTTTGCCTCCCTGC	
PFI4552 F	GCACTTCAAACAAGTGTGACAA	{ verificatie pCMPG7387 en pCMPG7388
NeoR2 R	TAGCCGAATAGCCTCTCCAC	
pNOS S1 F	GCGGAGAATTAAGGGAGTCA	
PFI5116 F	GGGTCCTAACCAAGAAAATGAA	{ verificatie pCMPG7403 en pCMPG7404
PFI4800 R	TGTTTCAAACACTACCTGGTGGA	
PFI5117 F	GATTTGGGGGAGATCTGGTT	{ verificatie pCMPG7389
PFI5118 R	CCAAACGTAAAACGGCTTGT	
PFI5056 R	TTCGCAAGACCCTTCCTCTA	
PFI5057 F	TGGCATCAACAAACCACCTA	
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	{ verificatie pUBI-gusA-intron in TOPO- vector pCRII
M13 R	GCGGATAACAATTCACACAGG	
picA F	ATGCGCATGAGGCTCGTCTTCGAG	{ detectie <i>Agrobacteria</i>
picA R	GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT	

F= forward primer, R= reverse primer

Voor het ontwerp van de primers werd gebruikt gemaakt van volgende *in silico*-programma's:

- 'Primer3', versie 0.4.0: primerontwerp (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)
- 'DNA calculator': berekening van de smelttemperatuur van de primers en het controleren van secundaire structuren (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>)

2.1.2.13 DNA-sequentiebepaling en *in silico* analyse

DNA-sequentiebepaling door Macrogen (Seoul, Korea) werd gehanteerd als vierde verificatiemethode om te bevestigen of de opgegroeide kolonies het correcte, nieuw aangemaakte vectorconstruct bevatten. Tabel 12 geeft een overzicht van de primers die gebruikt werden voor sequentiebepaling.

Tabel 12 Overzicht van de gebruikte primers voor sequentiebepaling van de bekomen vectoren.

Naam primer	Sequentie 5' → 3'	Doel
PFI4552 F	GCACTTCAAACAAGTGTGACAA	sequentiebepaling van pCMPG7387 en pCMPG7388
NeoR2 R	TAGCCGAATAGCCTCTCCAC	
PFI4553 R	GGCATGAACTTCGGTGAAAA	
PFI4801 R	TACAGCGAAGAGGCAGTCAA	
OWB 425 R	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	
OWB 426 F	GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA	
PFI4800 R	TGTTTCAAACCTACCTGGTGGA	
PFI4799 R	CTGTCCGCATCCAGAAATTG	
PFI4798 R	TTGTCACTTGTGTTGAAGTGC	
pNOS S3 F	AATCCCCTCGGTATCCAAT	
PFI4796 F	GATCTCGTCGTGACACATGG	
PFI4797 F	AGATCCCGATCGTTCAAACA	sequentiebepaling van pCMPG7403 en pCMPG7404
PFI5116 F	GGGTCCTAACCAAGAAAATGAA	
GUSAR F	CAACAGACGCGTGGTTACAG	
PFI5118 R	CCAAACGTAAAACGGCTTGT	
PFI4801 R	TACAGCGAAGAGGCAGTCAA	
GUS3 R	TGGCGGAAGCAAC	sequentiebepaling van pCMPG7389
PFI4799 R	CTGTCCGCATCCAGAAATTG	
PFI4996 F	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGC	
PFI5057 F	TGGCATCAACAAACCACCTA	

De bekomen sequenties werden vergeleken met de theoretisch verwachte sequentie door verschillende *in silico*-analyses:

- Clustal W website en GENEious: gebruikt voor alignering van de verkregen en theoretisch verwachte sequenties (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; Dummond *et al.*, 2010)
- nucleotidenblast NCBI: het zoeken van overeenkomsten tussen een gevraagde sequentie en alle sequenties die in databanken opgeslagen zijn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)
- Expasy: translatie van een DNA-sequentie naar een aminozuursequentie (<http://expasy.org/>)
- PLACE: het zoeken van motieven in een plantpromotor (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)

2.1.2.14 Glycerolstocks

Voor het langdurig bewaren van finale vectoren worden glycerolstocks aangemaakt:

- *E. coli*: 900 µl 50% (v:v) glycerol + 900 µl vloeibare bacteriecultuur (overnacht opgegroeid in selectief LB-medium)
- *A. tumefaciens*: 450 µl 80% (v:v) glycerol + 900 µl vloeibare bacteriecultuur (24 u opgegroeid in selectief YEP-medium)

2.1.2.15 Overzicht gebruikte en aangemaakte vectoren

Tabel 13 en 14 geven een overzicht van de primaire, intermediaire en finale vectoren voor het kloneringswerk. Het intron dat bij het reporter gen *gusA* van enkele vectoren vermeld wordt, is het castorbean catalase intron, afkomstig uit de commercieel beschikbare pCAMBIA-vectoren (CAMBIA®, Australië). De sequentie van alle vectoren uit Tabel 13 en 14 zijn beschikbaar in de databank GENEious van het CMPG.

Tabel 13 Overzicht van gebruikte primaire en intermediaire vectoren voor het kloneringswerk.

Vector	Componenten van belang in het kloneringswerk	Bacterieselectiemerker
pFAJ3411*	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> - tNOS	Ap(R)
VpPZ200ML*	RB, LB	Sm(R)/Sp(R)
VpFAJ3223*	RB, tabMARs, LB	Sm(R)/Sp(R)
VpPZP200ML-pFAJ3411*	RB, pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> - tNOS, LB	Ap(R)
VpFAJ3223-pFAJ3411*	RB, tabMAR, pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> - tNOS, tabMAR, LB	Ap(R)
pSAT1A°	pNOS - neo - tNOS	Ap(R)
VpFAJ3552*	pCSVMV-glucanase-tMAS	Ap(R)
VpFAJ3142*	penh35S(TMV)-tNOS	Ap(R)
pCMVFL3*	cDNA van 3' uiteinde van <i>rdr6</i> van <i>O. sativa</i>	Ap(R)
pCMPG7389*	penh35S(TMV)- glucanase-tMAS	Ap(R)

* gestockeerd in het CMPG-PFI, ° gestockeerd in het Laboratorium voor Tropische Plantenteelt

Tabel 14 Overzicht van de finale vectoren met en zonder tabMARs en positieve controlevectoren voor de banaantransformaties.

Vector	Promotor-reportergen-terminator	Bacterieselectie- merker	Plantselectie- merker
pCMPG7387*	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gus</i> - tNOS	Sm(R)/Sp(R)	Gen(R)
pCMPG7388*	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> - tNOS	Sm(R)/Sp(R)	Gen(R)
pLSKUL23°	p35S - <i>gusA</i> met intron- tNOS	Km(R)	Hyg(R)
pLSKUL25°	pUBI - <i>gusA</i> met intron- tNOS	Km(R)	Hyg(R)
pCMPG7403*°	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> met intron - tNOS	Sm(R)/Sp(R)	Gen(R)
pCMPG7404*°	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> met intron - tNOS	Sm(R)/Sp(R)	Gen(R)
pETKUL19°	pUBI uit <i>Z. mays</i> - <i>gusA</i> met intron - tNOS	Km(R)	Gen(R)

* gestockeerd in het CMPG-PFI, ° gestockeerd in het Laboratorium voor Tropische Plantenteelt

2.2 Aanmaak van transgene bananenculturen

2.2.1 Embryogene celsuspensies en cultuurcondities

In Tabel 15 worden de gebruikte antibioticum stockoplossingen weergegeven om enerzijds transgeen plantenmateriaal te selecteren en anderzijds *A. tumefaciens* af te doden. In Tabel 16 worden de nodige componenten voor YM-medium en ZZ-medium, om resp. *A. tumefaciens* uit te platen voor de banaantransformatie en om getransformeerde celsuspensie op te laten groeien. Semi-vast ZZ-medium had voor het autoclaveren een *pH* van $\pm 6,12$ en $\pm 5,8$ na autoclaveren. Vloeibaar ZZ-medium werd gebruikt voor banaantransformaties en bevatte geen Phyta gel.

Tabel 15 Antibioticumstockoplossingen voor de selectie van transgeen plantenmateriaal en de afdoding van *A. tumefaciens*.

Antibioticum	Concentratie voor <i>A. tumefaciens</i> (mg/l)
Geneticine (G)	50
Hygromycine (H)	50
Timentin (T)	200

Tabel 16 Samenstelling van het YM- en ZZ-medium.

YM-medium		ZZ-medium	
Component	Concentratie (g/l)	Component	Concentratie
NaCl	0,1	½ MS-poeder	2,17 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	Vitamine MS	1 ml/l
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,5	ascorbinezuur	1 ml/l
Bacto gistextract	0,4	zeatine	1 ml/l
Mannitol	10	sucrose	30 g/l
Bacteriologische Agar	15	2,4D (10 ⁻³ M)	5 ml/l
		Phyta gel	3 g/l

Embryogene celsuspensies (ECSs) afkomstig van de triploïde banaancultivar ‘Williams’ (AAA groep) werden bekomen uitgaande van *in vitro* prolifererende meristemen zoals beschreven door (Strosse et al., 2006). De ECSs werden onderhouden in vloeibaar ZZ-medium. Ze werden opgekweekt in 250 ml erlenmeyers met een startdensiteit van ongeveer 1 ml ‘Settled Cell Volume’ (SCV) in 80 ml vloeibaar ZZ-medium. De cellen werden geïncubeerd op een schudincubator (70 rpm) in het donker bij een temperatuur van 26 ± 2°C. Tweewekelijks werd ongeveer 75% van het ZZ-medium verversd en werd de celdensiteit terug verlaagd. Cellen die zich in de vroege log-fase van de groei bevonden (8 dagen na subcultuur) werden gebruikt voor de transformatie.

Voor transformatie werd gebruik gemaakt van 2 twee sterk virulente *A. tumefaciens*-stammen:

- EHA105 (Hood et al., 1993) wat een kanamycinegevoelige afgeleide is van de stam EHA101: bevatte apart de vectoren pLSKUL23, pLSKUL25 en pETKUL19.
- EHA101 (Hood et al., 1986): bevatte apart de vectorconstructen pCMPG7388, pCMPG7387, pCMPG7404 en pCMPG7403.

De *A. tumefaciens*-bacteriën werden bewaard bij -80°C in selectief YEP-medium. Voor gebruik werden ze uitgeplaat op selectief YM-medium.

2.2.2 Plantmanipulaties in *Musa spp.*

2.2.2.1 Banaantransformatie gemedieerd door Agrobacterium tumefaciens

De transformatie werd in essentie uitgevoerd zoals beschreven door Pérez-Hernández *et al.* (2006).

Een bacteriële suspensie werd aangemaakt door overbrengen van één *A. tumefaciens* kolonie van de streepenting op een YM-plaat naar 3 mL vloeibaar YEP-medium waaraan de gepaste antibiotica werden toegevoegd: Sp¹⁰⁰/Sm³⁰⁰ voor pCMPG7388 en pCMPG7387 in experiment 1 en tevens voor pCMPG7404 en pCMPG7403 in experiment 2. De culturen werden ongeveer 30 u geïncubeerd in een schudincubator (210 rpm) bij 28°C tot een OD₆₀₀ van ongeveer 1,5 eenheden. Deze culturen werden gecentrifugeerd bij 4000 g gedurende 10 min. Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd opnieuw opgelost in vloeibaar ZZ-medium (pH 5,6) waaraan acetosyringone (AS) werd toegevoegd tot een finale concentratie van 200 µM. Vloeibaar ZZ-medium met AS werd toegevoegd tot een OD₆₀₀ van 0,39-0,42 eenheden werd bereikt.

Van deze bacteriële suspensie werd 1 ml per 'well' toegevoegd in een '24-well' microtiterplaat waarin zich reeds 200 µl van een 33% SCV 'Williams' embryogene celsuspensie bevond. De infectieplaten werden gedurende 6 u bij 25°C en in het donker in een schudincubator (25 rpm) geïncubeerd. Na deze incubatie werden de mengsels overgebracht naar een steriel 50 µm polyester mesh dat op steriel filterpapier werd geplaatst voor het verwijderen van overtollig vloeibaar medium en *Agrobacteria*. Vervolgens werd de mesh met de geïnfecteerde cellen overgebracht naar 5 cm petriplaten met per plaat 10 ml co-cultivatiedmedium (halfvast ZZ-medium met pH 5,6 en 200 µM AS). De platen werden gedurende 6 dagen geïncubeerd bij 21°C in het donker. Deze zesdaagse periode is de transiënte fase.

2.2.2.2 Selectie van transgene celkolonies

Na co-cultivatie werden de potentieel getransformeerde cellen met pCMPG7388 en pCMPG7387 voor experiment 1 of met pCMPG7404 en pCMPG7403 voor experiment 2 overgebracht naar selectief halfvast ZZ-medium (pH 5,8) met 50 µg/ml geneticine voor positieve selectie van transformanten en 200 µg/ml voor afdoding van de *Agrobacteria*. De potentieel getransformeerde cellen met de positieve controles pLSKUL23 en pLSKUL25 in experiment 1 werden echter met 50 µg/ml hygromycine geselecteerd. Voor de positieve controle pETKUL19 in experiment 2 werd ook 50 µg/ml geneticine gebruikt. De stalen ondergingen een tweewekelijkse subcultuur naar vers, selectief ZZ-medium. Deze periode is de stabiele fase.

2.3 Analyse van de GUS-activiteit

2.3.1 Kwalitatieve histochemische kleuring

Hiervoor wordt verwezen naar Bertier (2008) blz. 35 - 36.

2.3.2 Kwantitatieve enzymatische test

Hiervoor wordt verwezen naar Wagaba (2008) blz. 31 - 35.

2.3.2.1 Eiwitextractie

2.3.2.2 MUG-test

De metingen van de absorpties en fluorescenties gebeurden met de ‘multi-reader’ Synergi™ (Biotek). De berekeningen en grafische weergave van de resultaten gebeurden door middel van de software Microsoft Excel 2004 versie 11.6.2 (Microsoft Corporation).

2.4 Statistische analyse

Voor de berekeningen in 2.4.1 en 2.4.4 werd gebruik gemaakt van de rekensoftware Microsoft Excel 2004 versie 11.6.2 (Microsoft Corporation). Voor de berekeningen in 2.4.2 en 2.4.3 werd gebruik gemaakt van de software STATISTICA® versie 7.1 (Statsoft. Inc. USA).

2.4.1 Parametrische test: ‘one-way’ ANOVA

Parametrische testen worden bij voorkeur toegepast wanneer de dataset getypeerd wordt door een normale verdeling en bij grote datasets (bijvoorbeeld $n > 100$). Deze testen hebben bovendien een grotere ‘statistische kracht’ dan niet-parametrisch testen en zijn met andere woorden gevoeliger om statistisch significante verschillen te detecteren (Hill en Lewicki, 2007).

ANOVA staat voor ‘Analysis of Variance’ en is een statistische procedure om verschillende groepen van data te vergelijken. Aangezien met één afhankelijke variabele wordt gewerkt, de GUS-activiteit (pmol MU/u x µg eiwit), spreekt men over ‘one-way’ ANOVA. Om na te gaan of er een statistisch significant verschil is tussen verschillende groepen met deze test, moet aan twee assumpties voldaan zijn die in 2.4.2.1 worden besproken. Wanneer vervolgens de berekende p-waarde kleiner of gelijk was aan 0,05 werd besloten dat de groepsgemiddelden significant verschilden.

2.4.1.1 Shapiro-Wilk's test en Levene's test

- Assumptie 1: de afhankelijke variabele is normaal verdeeld in alle datasets

Dit werd getest met de Shapiro-Wilk's test. De nulhypothese is dat de populatie normaal verdeeld is. Wanneer de p-waarde berekend aan de hand van de teststatistiek kleiner was dan het gekozen α -niveau 0,05 werd de nulhypothese verworpen. Wanneer de p-waarde echter groter of gelijk was aan 0,05 werd de normaliteit niet verworpen (Hill en Lewicki, 2007).

- Assumptie 2: de varianties van alle datasets zijn homogeen

Dit werd getest met de Levene's test. De nulhypothese is dat de varianties van de populatie gelijk zijn of met andere woorden homogeen. Wanneer de p-waarde berekend aan de hand van de teststatistiek kleiner was dan het gekozen α -niveau 0,01 werd de nulhypothese verworpen. In dat geval werden de datasets logaritmisch getransformeerd en werd de Levene's test opnieuw uitgevoerd voor de log-getransformeerde datasets. Wanneer de p-waarde echter groter of gelijk was aan 0,01 werd de normaliteit niet verworpen (Hill en Lewicki, 2007).

2.4.1.2 Tukey's test/ Unequal HSD test en Duncan's test

Post-hoc testen werden uitgevoerd om de datasets paarsgewijs te vergelijken. Tukey's test of Unequal HSD (Honest Significant Difference) werden gebruikt om te detecteren tussen welke twee datasets de significante verschillen tussen de groepsgemiddelden konden waargenomen worden. Tukey's test werd gebruikt bij datasets van gelijke grootte, Unequal HSD werd gebruikt bij datasets van verschillende groottes. Ook de Duncan's test werd voor toegepast voor een paarsgewijze vergelijking, maar verschilt van Tukey's test en Unequal HSD door minder vals-negatieve (Type II) fouten en meer vals-positieve (Type I) fouten.

2.4.2 Niet-parametrische testen

Niet-parametrische testen worden bij voorkeur toegepast wanneer de dataset van lagere kwaliteit is. Dit wil zeggen dat men te maken heeft met een kleine steekproef (vuistregel: $n \leq 6$) en met datasets waarvan de distributie niet gekend is. De data worden dan vervangen door een rangorde en de teststatistiek wordt gebaseerd op de mediaan (Ollevier en Wenseleers, 2000; Hill en Lewicki, 2007).

2.4.2.1 *Kruskal-Wallis*

De Kruskal-Wallis test is het niet-parametrisch alternatief voor ANOVA om te detecteren of k onafhankelijke datasets afkomstig zijn uit verschillende populaties. Wanneer de berekende p-waarde kleiner of gelijk was aan 0,05 werd besloten dat minstens één van de onderzochte datasets significant verschilde van minstens één van de andere datasets.

2.4.2.2 *Mann-Whitney's test*

Mann-Whitney's test is een niet-parametrische test om na te gaan of twee onafhankelijke groepen significant verschillen. Wanneer de berekende p-waarde kleiner of gelijk was aan 0,05 werd besloten dat de ene onderzochte dataset significant verschilde van de andere.

2.4.3 Sterktes en zwaktes van gebruikte statistische testen

Om significante verschillen te detecteren werden zowel parametrische als niet-parametrische testen uitgevoerd, aangezien het lage aantal biologische herhalingen (maximaal 6) per construct onzekerheid bood over de bekomen resultaten. Het gebruik van parametrische testen, in dit geval 'one-way' ANOVA, maakt het mogelijk een volledige populatie te simuleren op basis van een aantal metingen. Hiervoor moet echter wel aan de assumpties voor normaliteit en homogeniteit van de varianties voldaan worden. Een nadeel in deze context is dat deze testen ontworpen waren voor een 50 à 100 herhalingen. Bijgevolg konden foute conclusies getrokken worden, wanneer de 6 herhalingen in dit experiment niet voldoende correct de volledige populatie weergaven. Voor een paarsgewijze vergelijking van de drie verschillende groepen werd zowel Tukey's als Duncan's test uitgevoerd. Hierbij is geweten dat Duncan's test minder vals-negatieve (Type II) fouten maakt, maar wel meer vals-positieve (Type I) fouten.

Indien met een laag aantal herhalingen (≤ 6) gewerkt wordt en geen voorafgaande assumpties gemaakt worden, gebruikt men eerder niet-parametrisch testen. In dit geval werd de Kruskal-Wallis test toegepast en voor een paarsgewijze vergelijking Mann-Whitney's test. Een nadeel in deze context is dat deze testen minder krachtig en meer conservatief zijn, want zij baseren zich enkel op de gegeven metingen en niet op een volledige populatie. Bijgevolg lag de zekerheid waarmee conclusies getrokken werden in dit experiment lager dan bij de parametrische testen. In Tabel 17 wordt een overzicht gegeven voor het gebruik van de verschillende besproken statistische testen om

significante verschillen te detecteren voor het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie in populaties.

Tabel 17 Gebruik van statistische testen voor de detectie van significante verschillen voor het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie in datasets.

	Parametrische testen		Niet-parametrische testen
Detectie van een significant verschil tussen meerdere datasets	'one way' ANOVA		Kruskal -Wallis test
Detectie van een significant verschil tussen twee datasets	Tukey/Unequal HSD of Duncan 's test <i>(niveau van transgenexpressie)</i>	F-test <i>(variabiliteit van transgenexpressie)</i>	Mann-Whitney 's test <i>(niveau en variabiliteit van transgenexpressie)</i>

2.4.4 Coëfficiënt van de variantie

De coëfficiënt van de variantie (CV) is een maat voor de relatieve spreiding van de data in een set waarnemingen. Deze spreidingsmaat brengt in rekening dat de variabiliteit vaak groter is bij hogere groepsgemiddelden.

$$CV(\%) = \frac{s}{\mu} \times 100$$

met s = standaardafwijking van de GUS-activiteit van alle stalen van een vector

μ = gemiddelde van de GUS-activiteit van alle stalen van een vector

3. Resultaten en bespreking

3.1 *Aanmaak van vectoren voor geoptimaliseerde transgenexpressie in Musa accuminata*

3.1.1 Doelstelling voor de MARs-vector

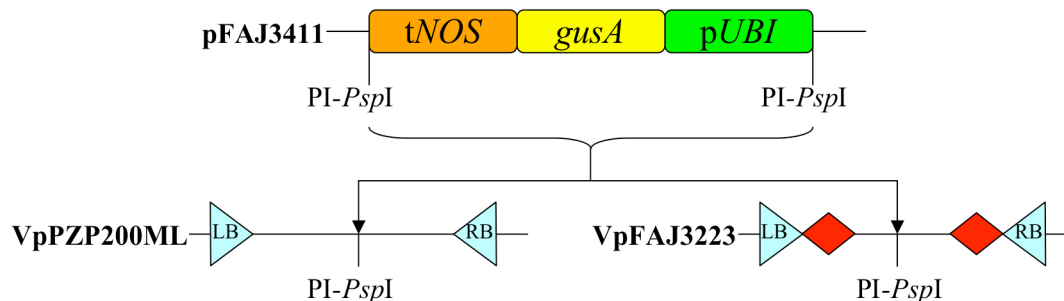
In dit eerste gedeelte werden vectoren aangemaakt om de transgenexpressie in *Musa spp.* te optimaliseren. Volgens een eerste benadering werden daarvoor ‘matrix attachment regions’ uit *N. tabacum* (tabMARs) aangewend. Deze MAR-elementen werden uit *N. tabacum* geïsoleerd aan de hand van primers die homoloog waren aan reeds gepubliceerde H9 MARs uit *N. tabacum* (Iglesias *et al.*, 1997). Er werd geopteerd voor deze MARs, aangezien vectoren met tabMARs beschikbaar waren aan het CMPG-PFI en reeds gebruikt werden om de transgenexpressie te optimaliseren in de *A. thaliana* en *N. tabacum* (De Bolle *et al.*, 2007). Vertrekkend van deze vectoren werd een vector aangemaakt waarbij het T-DNA twee gencassettes geflankeerd door tabMARs bevat. In de eerste cassette wordt een β -glucuronidase reporter gen (*gusA*) aangedreven door een ubiquitine promotor uit *Zea mays* (pUBI). Het gebruik van *gusA* als reporter gen maakt het mogelijk de transgenexpressie te bestuderen aan de hand van zowel kwalitatieve (histochemische kleuring) als kwantitatieve testen (fluorometrische test). De pUBI is een frequent gebruikte, sterke constitutieve promotor voor monocotylen en vertoont in embryogene cellen van *Musa spp.* een sterkere activiteit dan p35S (Sàgi *et al.*, 1995). In de tweede cassette wordt een neomycineresistentiegen (*neo*), coderend voor een aminoglycoside 3'-fosfotransferase, aangedreven door een nopalinesynthase promotor (pNOS) uit *A. tumefaciens*. Het gebruik van *neo* als plantselectiemerker maakt het mogelijk getransformeerde cellen van *Musa spp.* te selecteren op een medium dat geneticine bevat (Pérez Hernández *et al.*, 2006).

3.1.2 Kloneringsstrategie en resultaten voor de MARs-(controle)vector

Voor dit kloneringswerk werd gebruikt gemaakt van twee destinatevectoren: VpPZP200ML voor de aanmaak van de MARs-controlevector en VpFAJ3223 voor de aanmaak van de MARs-vector. Aan deze destinatevectoren werden in drie stappen cassettes of componenten toegevoegd afkomstig uit drie, reeds beschikbare, primaire vectoren: pFAJ3411, pSAT1A en pETKUL19. De belangrijkste componenten van zowel de destinatevectoren, als de primaire vectoren worden weergegeven in Tabellen 13 en 14 (paragraaf 2.1.2.15).

3.1.2.1 VpPZP200ML-pFAJ3411 (intermediaire MARs-controlevector) en VpFAJ3223-pFAJ3411 (intermediaire MARs-vector)

In een eerste stap werd de cassette p*UBI-gus-tNOS* uit pFAJ3411 geknipt door PI-*PspI*, zoals weergegeven in Figuur 8. Tezelfdertijd werden VpPZP200ML en VpFAJ3223 uniek geknipt door PI-*PspI*. Alle restrictieproducten werden op gel geplaatst, samen met de bijhorende originele, ongeknipte plasmidenproducten als negatieve controle. Van het geknipt pFAJ3411 werd de band van ca. 4000 bp uit gel geïsoleerd, zoals beschreven in 2.1.2.7. Deze band is de cassette p*UBI-gus-tNOS*. Van de geknipte VpPZP200ML en VpFAJ3223 werd het enige aanwezige bandje uit gel geïsoleerd en gedefosforyleerd om zelfligatie te verhinderen, zoals beschreven in 2.1.2.8. Nadien werd de cassette p*UBI-gus-tNOS* geligeerd in de vectoren VpPZP200ML en VpFAJ3223, zoals beschreven in 2.1.2.9. Op deze manier werden de intermediaire MARs-controlevector VpPZP200ML-pFAJ3411 en de intermediaire MARs-vector VpFAJ3223-pFAJ3411 gevormd. Tenslotte werden de bekomen constructen gebruikt om chemisch competente *E. coli*-cellen te transformeren, zoals beschreven in 2.1.2.11. De kolonies die overnacht opgroeiden werden via twee methodes gecontroleerd op de aanwezigheid van correcte intermediaire vectorconstructen: kolonie-PCR en ‘restrictiedigest’, zoals beschreven in respectievelijk 2.1.2.12 en 2.1.2.3.



Figuur 8 Aanmaak intermediaire MARs-controlevector VpPZP200ML-pFAJ3411 en intermediaire MARs-vector VpFAJ3223-pFAJ3411. De eerste primaire vector pFAJ3411 bevat het reportergen *gus* (geel) geflankeerd door promotor p*UBI* (groen) en terminator t*NOS* (oranje). De eerste destinatevector VpPZP200ML bevat een linker- en rechtergrenssequentie (resp. LB en RB) (lichtblauwe driehoeken). De tweede destinatevector VpFAJ3223 bevat naast de linker- en rechtergrenssequentie ook tabMARS (rode ruiten). Door restrictie met PI-*PspI* wordt de cassette p*UBI-gus-tNOS* uit pFAJ3411 geknipt en geligeerd in zowel VpPZP200ML, als VpFAJ3223. Op deze manier bekomt men respectievelijk VpPZP200ML-pFAJ3411 en VpFAJ3223-pFAJ3411.

KOLONIE-PCR

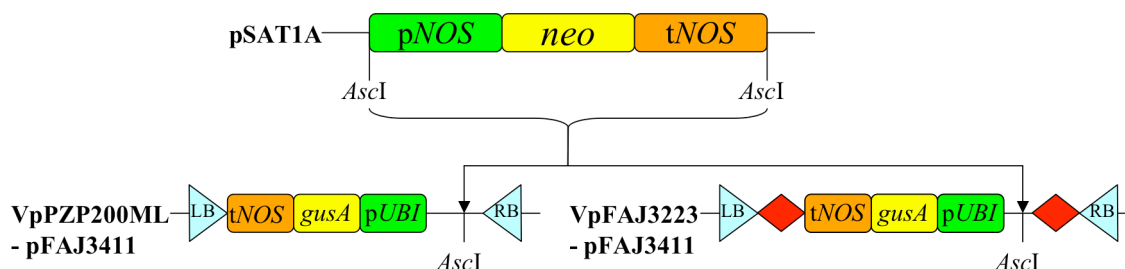
De eerste verificatiemethode bestond uit een kolonie-PCR aan de hand van primerkoppel PFI3620 en PFI3621 (data niet getoond). De ligging van deze primers wordt weergegeven in Figuur 13 op blz. 60.

RESTRICTIEDIGEST

De tweede verificatiemethode bestond uit een 'restrictiedigest' met PI-*PspI* (data niet getoond). De ligging van de restrictieplaats van PI-*PspI* wordt weergegeven in Figuur 13 op blz. 60.

3.1.2.2 *VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A= pCMPG7387* (MARs- controlevector zonder intron) en *VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A= pCMPG7388* (MARs-vector zonder intron)

In een tweede stap werd de cassette *pNOS-neo-tNOS* uit *pSAT1A* geknipt door *AscI*, zoals beschreven in 2.1.2.3 en weergegeven in Figuur 9. Tezelfdertijd werden *VpPZP200ML-pFAJ3411* en *VpFAJ3223-pFAJ3411* uniek geknipt door *AscI*. Alle restrictieproducten werden op gel geplaatst, samen met de bijhorende originele, ongeknipte plasmideproducten als negatieve controle. Van het geknipt *pSAT1A* werd de band van 1586 bp uit gel geïsoleerd, zoals beschreven in 2.1.2.7. Deze band is de cassette *pNOS-neo-tNOS*. Van de geknipte *VpPZP200ML-pFAJ3411* en *VpFAJ3223-pFAJ3411* werd het enige aanwezige bandje uit gel geïsoleerd en gedefosforyleerd om zelfligatie te verhinderen, zoals beschreven in 2.1.2.8. Nadien werd de cassette *pNOS-neo-tNOS* geligeerd in de vectoren *VpPZP200ML-pFAJ3411* en *VpFAJ3223-pFAJ3411*, zoals beschreven in 2.1.2.9. Op deze manier werden de finale MARs-controlevector *VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A* of *pCMPG7387* en de finale MARs-vector *VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A* of *pCMPG7388* gevormd. Tenslotte werden de bekomen constructen gebruikt om chemisch competente *E. coli*-cellen te transformeren, zoals beschreven in 2.1.2.11. De kolonies die overnacht opgroeiden werden via drie methodes gecontroleerd op de aanwezigheid van correcte finale vectorconstructen: kolonie-PCR, 'restrictiedigest' en sequentiebepaling, zoals beschreven in resp. 2.1.2.12, 2.1.2.3 en 2.1.2.13.



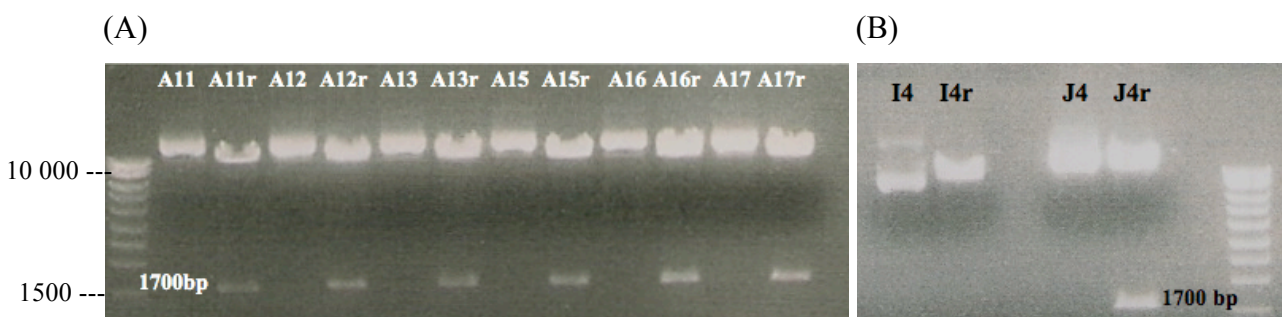
Figuur 9 Aanmaak finale MARs-controlevector *pCMPG7387* en MARs-vector *pCMPG7388*. De tweede primaire vector *pSAT1A* bevat het plantselectiemerker *neo* (geel), geflankeerd door promotor *pNOS* (groen) en terminator *tNOS* (oranje). Door restrictie met *AscI* worden deze drie componenten samen uit *pSAT1A* geknipt en geligeerd in zowel *VpPZP200ML-pFAJ3411*, als *VpFAJ3223-pFAJ3411*. Op deze manier bekomt men respectievelijk *pCMPG7387* en *pCMPG7388*. Bij deze vectoren bevat *gusA* echter geen intron.

KOLONIE-PCR

De eerste verificatiemethode bestond uit een kolonie-PCR aan de hand van twee primerkoppels aangezien de cassette voor geneticineresistentie *pNOS-neo-tNOS* in twee richtingen kon insereren bij de palindromische overhangende uiteindes die gecreeërd werden door *AscI*. Indien de cassette met *pNOS* langs *pUBI* geïnsereerd was (en dus in tegengestelde oriëntatie van de *gusA*-cassette), werd een band van 600 bp verwacht met primerkoppel PFI4552-NeoR2. Indien de cassette echter met *pNOS* aan de RB geïnsereerd was (en dus in zelfde oriëntatie als *gusA*-cassette), werd een band van 1700 bp verwacht met primerkoppel PFI4552-*pNOS* S1. De ligging van de primers wordt weergegeven in Figuur 13. Uit de bekomen PCR-producten gevisualiseerd op gel, kon niet duidelijk afgeleid worden in welke richting de cassette voor geneticineresistentie geïnsereerd was (data niet getoond). Vervolgens werden een aantal kolonies geselecteerd en gecontroleerd aan de hand van een tweede verificatiemethode

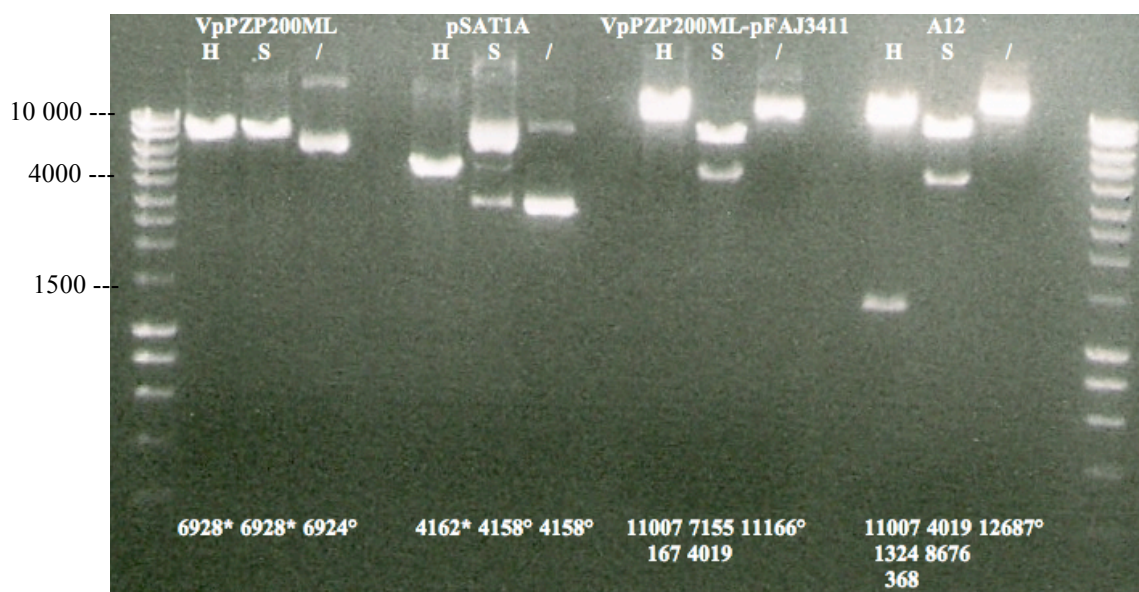
RESTRICTIEDIGEST

De tweede verificatiemethode bestond uit een ‘restrictiedigest’. Eerst werden de plasmiden geknipt met *AscI*, aangezien dit restrictie-enzym ook gebruikt werd voor de aanmaak van pCMPG7387 en pCMPG7388, zoals in Figuur 9 aangegeven. De producten van deze ‘restrictiedigest’ worden gevisualiseerd in Figuur 10. Indien de cassette voor geneticineresistentie (*pNOS-neo-tNOS*) succesvol uitgeknipt werd, verscheen een band van ca. 1700 bp. Voor pCMPG7387 werd voor alle geteste kolonies een correcte band gedetecteerd. Voor pCMPG7388 werd enkel voor kolonie J4 een correcte band gedetecteerd. Vervolgens werd kolonie A12 voor pCMPG7387 en kolonie J4 voor pCMPG7388 geselecteerd om onderworpen te worden aan bijkomende verificatie door restrictie.

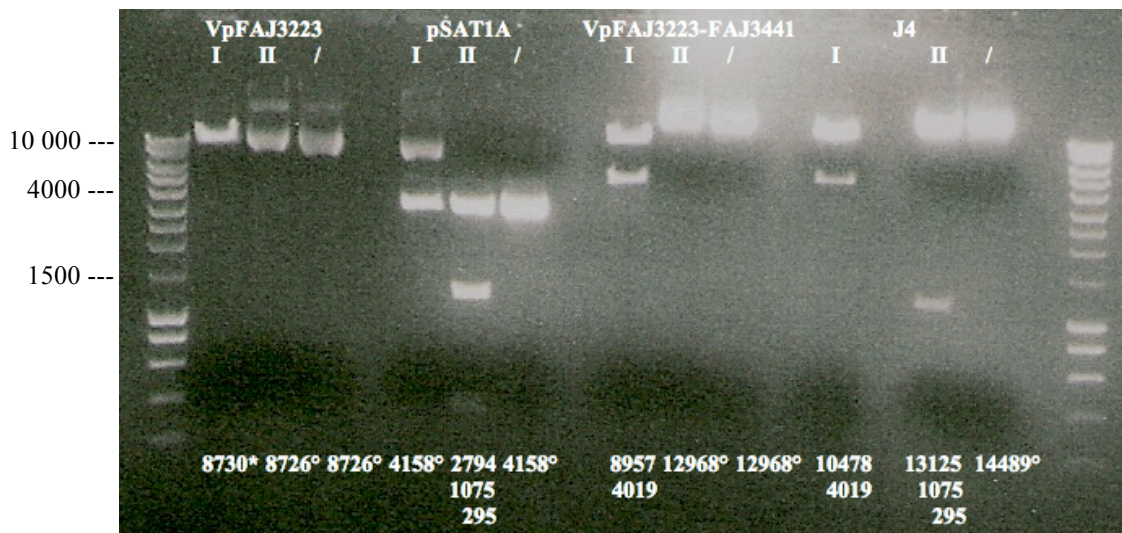


Figuur 10 ‘Restrictiedigest’ met *AscI* om na te gaan of het bekomen construct voor pCMPG7387 (A) en voor pCMPG7388 (B) de cassette voor geneticineresistentie (*pNOS-neo-tNOS*) bevat. Enerzijds wordt een band van ca. 1700 bp verwacht bij het geknipt staal. Dit vertegenwoordigt de cassette voor geneticineresistentie. Anderzijds wordt bij het bijhorende ongeknipte staal een band van ca. 12700 bp verwacht voor pCMPG7387 en een band van ca. 14500 bp voor pCMPG7388. Dit vertegenwoordigt de volledige vector. Legende: A= VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A, I= VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A 1:1 (insert:vector), J= VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A 3:1 (insert:vector), x= nummer van de geanalyseerde kolonie, r= restrictie met *AscI*.

Een extra ‘restrictiedigest’ werd uitgevoerd met *HindIII* en *SacI* voor pCMPG7387 en met *SacI* en *SacII* voor pCMPG7388. De restrictieplaatsen van deze enzymen worden weergegeven in Figuur 13 (blz. 60). Voor pCMPG7387 worden in Figuur 11 de resultaten weergegeven van de digest voor kolonie A12 en controles VpPZP200ML, pSAT1A en VpPZP200ML-pFAJ3411. Alle verwachte banden, die onderaan in Figuur 11 opgelijst staan, waren aanwezig. Echter, de band van 167 bp na restrictie van VpPZP200ML-pFAJ3411 met *HindIII* en de band van 368 bp na restrictie van A12 met *HindIII* waren nagenoeg onzichtbaar. Voor pCMPG7388 worden in Figuur 12 de resultaten weergegeven van de digest voor kolonie J4 en controles VpFAJ3223, pSAT1A en VpFAJ3223-pFAJ3411. Alle verwachte banden, die onderaan in Figuur 12 opgelijst staan, waren aanwezig. Echter, de band van 295 bp na restrictie van J4 met *SacII* was nagenoeg onzichtbaar.



Figuur 11 Extra ‘restrictiedigest’ met *HindIII* en *SacI* om de correctheid van het bekomen construct voor pCMPG7387 in kolonie A12 te verifiëren. VpPZP200ML, pSAT1A en VpPZP200ML-pFAJ3411 werden als controles onderworpen aan dezelfde ‘restrictiedigest’. De grootte van de verwachte bandjes werden steeds onderaan genoteerd (in bp). Legende: H= restrictie met *HindIII*, S= restrictie met *SacI*, /= geen restrictie, *= lineair plasmide, °= circulair plasmide met hoger gelegen ‘relaxed’ en lager gelegen ‘supercoiled’.



Figuur 12 Extra ‘restrictiedigest’ met *SacI* en *SacII* om de correctheid van het bekomen construct voor pCMPG7388 in kolonie J4 te verifiëren. VpFAJ3223, pSAT1A en VpFAJ3223-pFAJ3441 werden als controles onderworpen aan dezelfde ‘restrictiedigest’. De grootte van de verwachte banden werden steeds onderaan genoteerd. Legende: I= restrictie met *SacI*, II= restrictie met *SacII*, /= geen restrictie, *= lineair plasmide, °= circulair plasmide met hoger gelegen ‘relaxed’ en lager gelegen ‘supercoiled’ vorm.

SEQUENTIEBEPALING

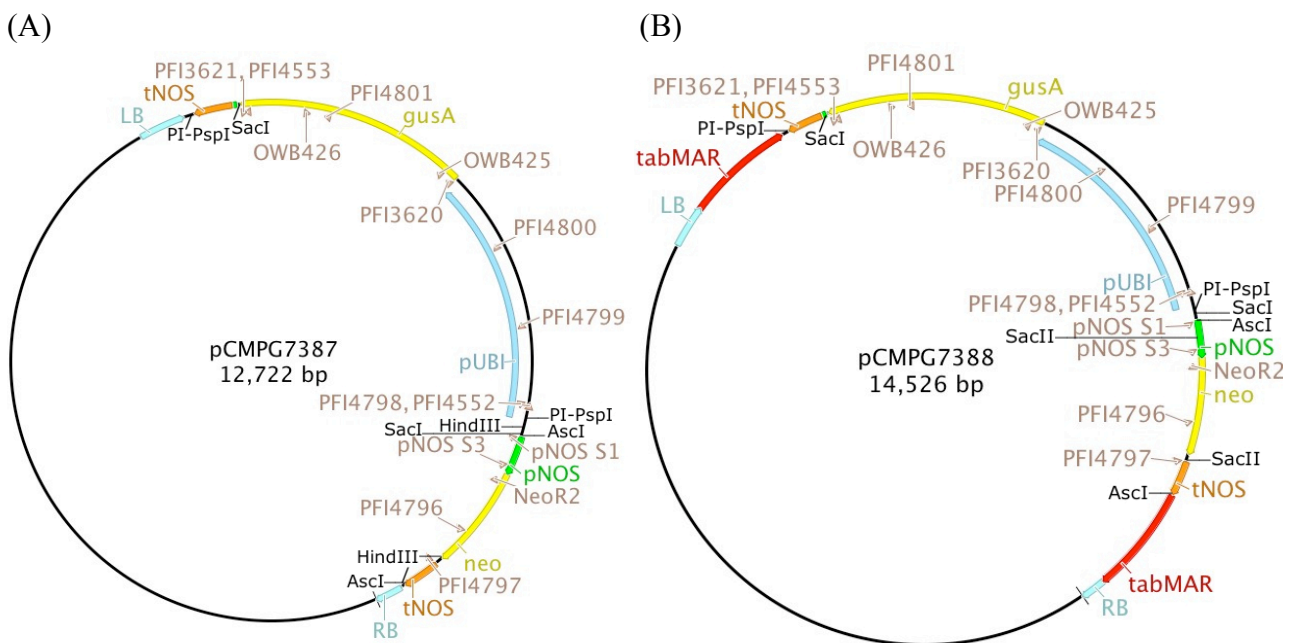
De derde verificatiemethode voor de finale transformatievectoren pCMPG7387 en pCMPG7388 bestond uit een sequentiebepaling. De verwachte sequenties werden vooraf opgeslagen in de GENEious databank van het CMPG. Een eerste maal werd een grovere sequentiebepaling uitgevoerd met primers PFI4552 en NeoR2 voor kolonies A11, A12, A16 en A17 voor pCMPG7387. De gesequeneerde delen van A11 en A16 vertoonden slechts ongeveer 30% overeenkomst met de verwachte sequentie voor pCMPG7387 waarbij de cassette voor geneticineresistentie met p*NOS* aan de zijde van p*UBI* geïnsereerd was. De gesequeneerde delen van A12 en A17 vertoonden echter ongeveer 95% overeenkomst. Een tweede maal werden primers PFI4553, PFI4801, OWB426, OWB425, PFI4800, PFI4799, PFI4798, p*NOS* S3, PFI4796 en PFI4797 gebruikt om de volledige T-DNA cassette van A12 en A17 te sequencen (Figuur 13). Volgende verschillen werden gedetecteerd ten opzichte van de verwachte sequentie voor pCMPG7387:

- (i) De aanwezigheid van een sequentie van 37 bp tussen *gusA* en *tNOS*. Na analyse in NEBcutter V2.0 bleek het om een ‘multiple cloning site’ te gaan.
- (ii) De aanwezigheid van een extra C/G, AATT/TTAA en CATG/GTAC in p*UBI*. Na een nucleotidenblast en een analyse van motieven in plantpromotoren, zoals beschreven in 2.1.2.13, werd geconcludeerd dat deze extra baseparen de functie van p*UBI* niet zouden veranderen. De sequenties die voor A12 en A17 bekomen waren, kwamen namelijk overeen met dezelfde componenten uit vectoren die reeds succesvol gebruikt waren in

transformatie-experimenten met *Arabidopsis* aan het CMPG-PFI en in andere experimenten.

(iii) Een puntmutatie in *neo*: TTT/AAA in plaats van TTC/AAG. Na een *in silico* translatie van de bekomen *neo*-sequentie, bleek de verandering in nucleotidesequentie geen invloed te hebben op de aminozuursequentie.

Er wordt verwacht dat deze gedetecteerde verschillen geen invloed zullen hebben op de expressie en de werking van alle componenten in de bekomen vector. De verschillen die gedetecteerd werden kunnen namelijk ook fouten zijn in de databank GENEious en niet in de aangemaakte sequenties. De sequentiebepaling, *in silico* analyse en resultaten van kolonie J4 voor pCMPG7388 waren analoog aan die voor pCMPG7387 kolonies A12 en A17.



Figuur 13 Voorstelling van de finale MARs-controlevector zonder intron in *gusA*, pCMPG7387 (A), en de finale MARs-vector zonder intron in *gusA*, pCMPG7388 (B). Beide vectoren bevatten als T-DNA een cassette voor geneticineresistentie *pNOS-neo-tNOS* en een cassette voor de expressie van een reporter gen *pUBI-gusA-tNOS*. pCMPG7388 bevat daarenboven *tabMARs* aan weerszijden van RB en LB. Ook wordt de ligging weergegeven van primers (bruin) en restrictieplaatsen (zwart) gebruikt in de verificatiemethodes bij de aanmaak van pCMPG7387 en pCMPG7388.

Bij de bespreking van de bekomen MARs-controlevector pCMPG7387 en MARs-vector pCMPG7388 werd ingezien dat het reporter gen *gusA* niet voorzien was van een intron. Bij transformatie van *Musa spp.* is er een transiënte fase waarin *A. tumefaciens*, die gebruikt werd voor de transformatie en die een vectorconstruct bevat, niet afgedood wordt door timentin. Dit is immers geldig voor elk transformatiesysteem met *A. tumefaciens* en heeft als nadelig effect dat niet alleen de *gusA* in bananencellen, maar ook de *gusA* in bacteriecellen tot expressie kan komen. In de histochemische en fluorometrische testen van de transiënte fase kan men dus niet onderscheiden of

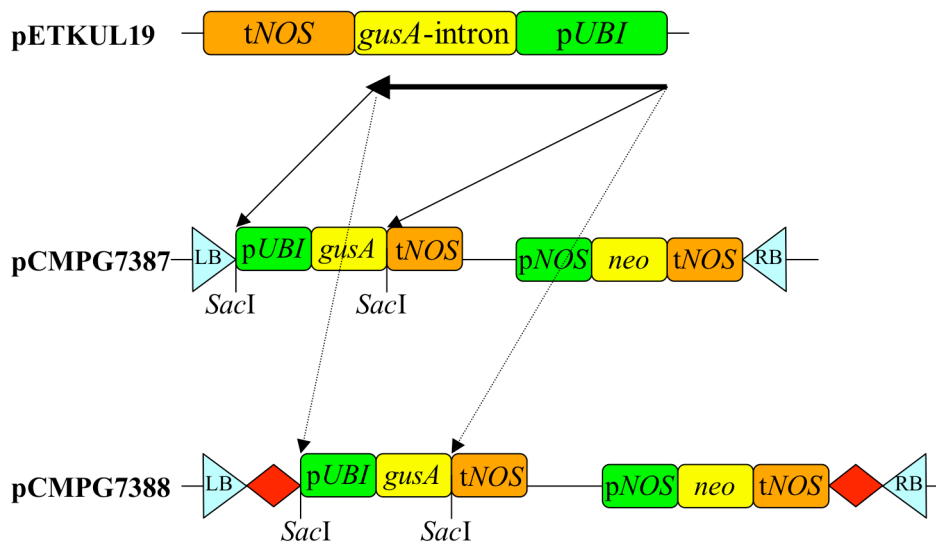
de gedetecteerde GUS-activiteit afkomstig is van plantmateriaal of bacteriemateriaal. Bij *Musa spp.* is de kans groter dat *Agrobacteria* achterblijven in de geselecteerde celkolonies, want dit gewas wordt vegetatief vermeerderd, zonder zaadfase. Ook in de stabiel fase blijft er een onzekerheid of alle *Agrobacteria* effectief afgedood zijn door timentin. Er werd toch besloten een banaantransformatie uit te voeren met pCMPG7388 en pCMPG7387 en bijkomende testen uit te voeren om deze nadelige effecten te kunnen minimaliseren (paragraaf 3.2.1, experiment 1). Ondertussen werd bijkomend kloneringswerk uitgevoerd om de fout te corrigeren (3.1.2.3) en nadien werd een nieuwe banaantransformatie ondernomen met volledig correcte vectoren (3.2.3).

3.1.2.3 VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19= pCMPG7404
(finale MARs-vector met intron) en
VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19= pCMPG7403
(finale MARs-controlevector met intron)

In een derde stap werden pCMPG7387 en pCMPG7388 gecorrigeerd. Om te beginnen werd p*UBI-gusA*-intron geamplificeerd uit pETKUL19 aan de hand van primers met *SacI*-knipplaatsen, PFI 5114 en 5115, zoals weergegeven in Figuur 14. Het bekomen PCR-amplicon (4250 bp) werd via een TA-subklonering geligeerd in de TOPO-vector pCRII, zoals beschreven in 2.1.2.10. Nadien werden chemische competente *E. coli*-cellen getransformeerd met het bekomen TOPO-construct. De kolonies die overnacht opgroeiden werden via twee methodes gecontroleerd op de aanwezigheid van correcte vectorconstructen: kolonie-PCR en sequentiebepaling, zoals beschreven in 2.1.2.12 en 2.1.2.13 (data niet weergegeven).

Vervolgens werd p*UBI-gusA*-intron uit pCRII geknipt met *SacI*. Tezelfdertijd werd p*UBI-gusA* (zonder intron) verwijderd uit pCMPG7387 en pCMPG7388 door restrictie met *SacI*, zoals beschreven in 2.1.2.3. Alle restrictieproducten werden op gel geplaatst, samen met de bijhorende originele, ongeknipte plasmideproducten als negatieve controle. Van de geknipte pCRII-p*UBI-gusA*-intron vector werd de band van ca. 4000 bp die p*UBI-gusA*-intron vertegenwoordigt uit gel geïsoleerd, zoals beschreven in 2.1.2.7. Van de geknipte pCMPG7387 en pCMPG7388 werden respectievelijk de band van ca. 8500 bp en 10500 bp uit gel geïsoleerd en gedefosforyleerd om zelfligatie te verhinderen, zoals beschreven 2.1.2.8. Nadien werd p*UBI-gusA*-intron geligeerd in de geknipte vectoren pCMPG7387 en pCMPG7388, zoals beschreven in 2.1.2.9. Op deze manier werden de finale MARs-controlevector VpPZP200ML-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19 of pCMPG7403 en de finale MARs-vector VpFAJ3223-pFAJ3411-pSAT1A-pETKUL19 of pCMPG7404 gevormd. Tenslotte werden de bekomen finale constructen gebruikt om chemisch competente *E. coli*-cellen te transformeren, zoals beschreven in 2.1.2.11. De kolonies die overnacht

opgroeiden werden net zoals pCMPG7387 en pCMPG7388 (3.1.2.2) via kolonie-PCR, ‘restrictiedigest’ en sequentie bepaling gecontroleerd op de aanwezigheid van correcte finale vectorconstructen.



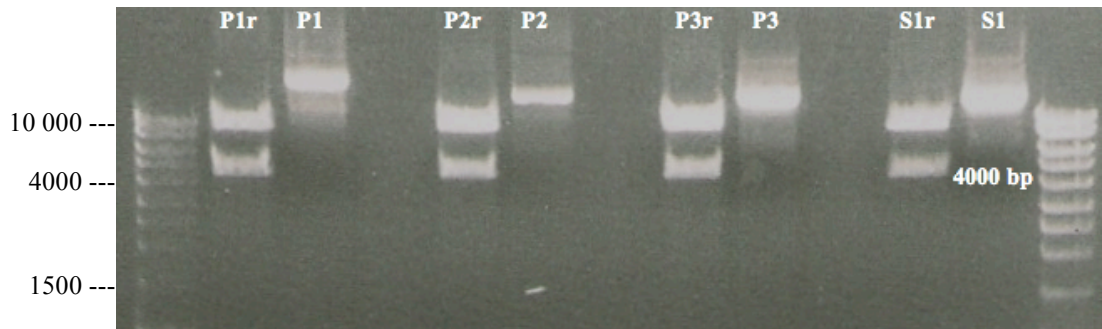
Figuur 14 Aanmaak finale MARS-controlevector pCMPG7403 en MARS-vector pCMPG7404. De primaire vector pETKUL19 bevat het reportergen *gusA* met intron (geel), geflankeerd door promotor *pUBI* (groen). Via PCR met primers die *SacI*-knipplaatsen bevatten, werden deze 2 componenten samen gekopieerd uit pETKUL19. Ondertussen werden het reportergen *gusA* zonder intron en de promotor *pUBI* uit pCMPG7387 en pCMPG7388 verwijderd door restrictie met *SacI*. Vervolgens kon het bestaande *pUBI-gusA* vervangen worden door het correcte *pUBI-gusA-intron* om uiteindelijk de finale MARS-controlevector pCMPG7403 en de finale MARS-vector pCMPG7404 te bekomen.

KOLONIE-PCR

De eerste verificatiemethode bestond uit een kolonie-PCR aan de hand van primerkoppels, PFI5116-PFI4800 en PFI5117-PFI5118, aangezien *pUBI-gusA-intron* in twee richtingen kon insereren bij de palindromische overhangende uiteindes die gecreeërd werden door *SacI*. Slechts één richting is correct (Figuur 14). Indien het *gusA-intron* vlak langs *tNOS* geïnsereerd was, werd een band van 600 bp verwacht met primerkoppel PFI5116-PFI4800. Indien echter *pUBI* vlak langs *tNOS* geïnsereerd was, werd een band van 1700 bp verwacht met primerkoppel PFI5117-PFI5118, maar deze situatie is foutief. De ligging van de primers wordt weergegeven in Figuur 17 op blz. 65. Na visualisatie van de bekomen PCR-producten op gel, kon niet duidelijk afgeleid worden in welke richting *pUBI-gusA-intron* geïnsereerd was (data niet getoond). Vervolgens werden een aantal kolonies geselecteerd en gecontroleerd aan de hand van een tweede verificatiemethode. Kolonies P1, P2 en P3 werden voor pCMPG7304 geselecteerd en kolonie S1 voor pCMPG7404.

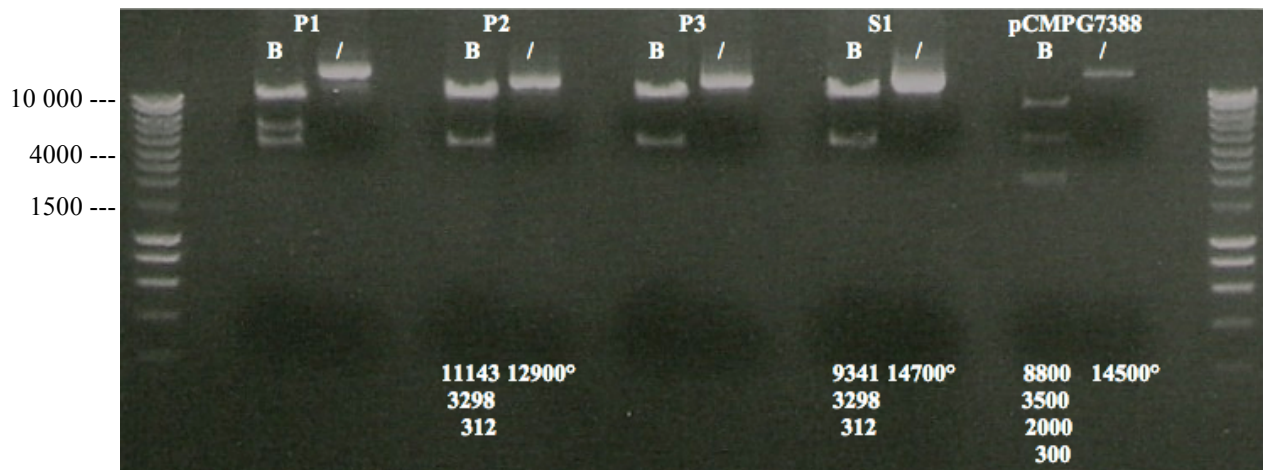
RESTRICTIEDIGEST

De tweede verificatiemethode bestond uit een 'restrictiedigest' aan de hand van *SacI*, aangezien dit restrictie-enzym ook gebruikt werd voor de aanmaak van pCMPG7304 en pCMPG704 zoals hierboven in Figuur 14. De producten van deze 'restrictiedigest' worden gevisualiseerd in Figuur 15. Indien *pUBI-gusA*-intron succesvol uitgeknipt werd, verscheen een band van van ca. 4000 bp. Voor pCMPG7304 en pCMPG7404 werden voor alle geteste kolonies een correct bandje gedetecteerd. Vervolgens werden al deze kolonies onderworpen aan een bijkomende restrictie, terwijl ze opgestuurd werden voor een sequentiebepaling.



Figuur 15 'Restrictiedigest' met *SacI* om na te gaan of de bekomen constructen voor pCMPG7403 en 7404 *pUBI-gusA*-intron bevatten. Enerzijds wordt een band van ca. 4000 bp verwacht bij het geknipt staal die *pUBI-gusA*-intron vertegenwoordigt. Hierbij zal de rest van de vector een band van ca. 8900 bp voor pCMPG7403 en een band van ca. 10700 bp voor pCMPG7404. Anderzijds wordt bij het bijhorende ongeknipte staal een band van ca. 12900 bp verwacht voor pCMPG7403 en ca. 14700 bp voor pCMPG7404. Deze bandjes vertegenwoordigen de volledige vector. Legende: P= pCMPG7387-pETKUL19 1:1 (insert:vector), S= pCMPG7388-pETKUL19 3:1 (insert:vector), x= nummer van de geanalyseerde kolonie, r= restrictie met *SacI*.

De extra 'restrictiedigest' aan de hand van *BamHI*. De restrictieplaasten van *BamHI* in pCMPG7403 en pCMPG7404 worden weergegeven in Figuur 17 op blz. 65. In Figuur 16 worden de producten van deze 'restrictiedigest' gevisualiseerd voor kolonies P1, P2, P3 en S1. Alle verwachte bandjes waren aanwezig voor P2, P3 en S1. Echter, de band van 312 bp bij P2, P3 en S1 en de band van 300 bp bij pCMPG7388 waren nagenoeg onzichtbaar. Kolonie P1 vertoonde een foutief restrictiepatroon.



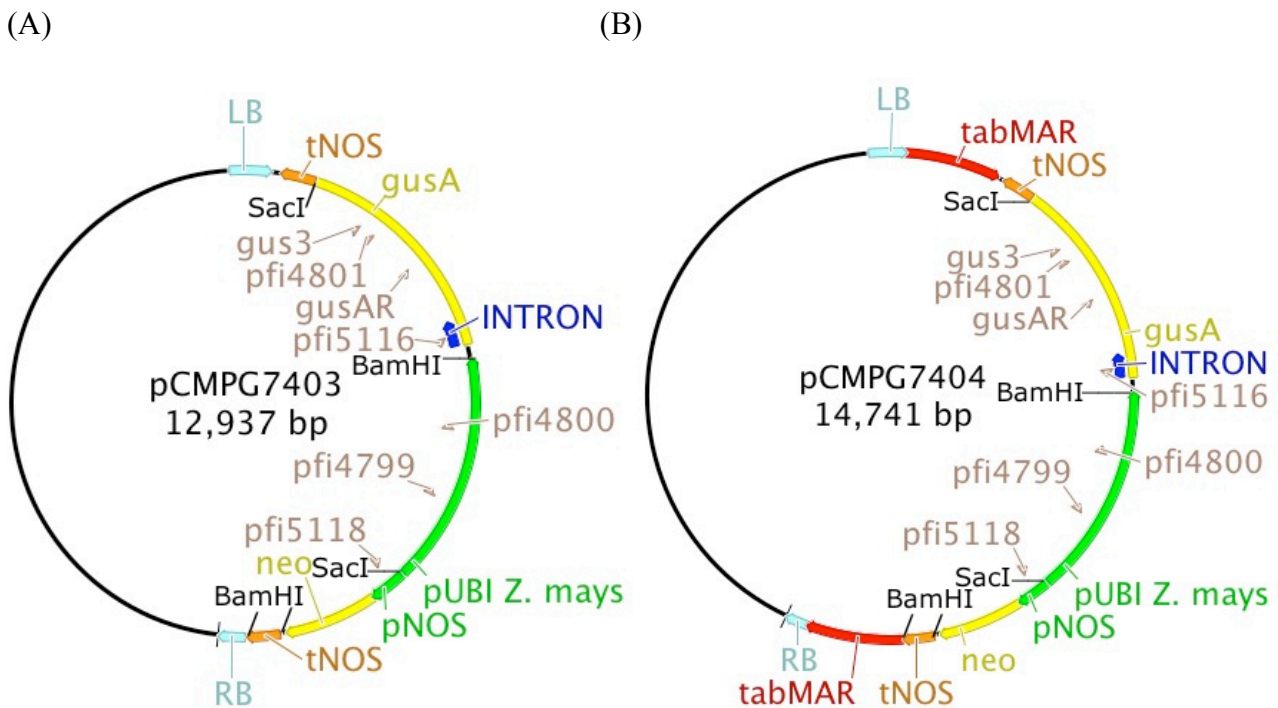
Figuur 16 Extra ‘restrictiedigest’ met *Bam*HI om de correctheid van het bekomen construct voor pCMPG7403 in kolonies P1, P2 en P3 te verifiëren, alsook het bekomen construct voor pCMPG7404 in kolonie S1. pCMPG7388 werd als controle onderworpen aan dezelfde ‘restrictiedigest’. De grootte van de verwachte bandjes werden steeds onderaan genoteerd. Legende: B= restrictie met *Bam*HI, /= geen restrictie, *= lineair plasmide, °= circulair plasmide met hoger gelegen ‘relaxed’ en lager gelegen ‘supercoiled’ vorm.

SEQUENTIEBEPALING

De derde verificatiemethode voor de finale transformatie vectoren pCMPG7103 en pCMPG7404 bestond uit een sequentiebepaling. Primers PFI5116, GUSAR, PFI5118, PFI4801, GUS3 en PFI4799 werden gebruikt voor sequentiebepaling en *in silico* analyse, zoals beschreven in 2.1.2.13. De ligging van deze primers op pCMPG7403 en pCMPG7404 wordt weergegeven in Figuur 17. Op deze manier kon voor potentiële pCMPG7403- en pCMPG7404-constructen de regio van *tNOS*, over *gus*-intron en *pUBI* tot *pNOS* gesequeneerd worden. De gesequeneerde delen van de constructen in P1, P2 en P3 vertoonden een hoge overeenkomst met de verwachte sequentie voor pCMPG7403. De gesequeneerde delen van het construct in S1 vertoonden ook een hoge overeenkomst met de verwachte sequentie voor pCMPG7404. Volgende verschillen werden gedetecteerd ten opzichte van de verwachte sequenties voor zowel pCMPG7403 als pCMPG7404 die opgeslagen worden in de GENEious databank van het CMPG:

- (i) De aanwezigheid van een extra C/G in *pUBI*. Na een nucleotidenblast werd besloten dat deze wijziging geen invloed zou hebben op het correct functioneren van de promotor, aangezien de bekomen sequenties overeenkwamen met reeds bestaande delen uit vectoren die succesvol aangewend werden in banaantransformatie-experimenten op het Laboratorium Tropische Plantenteelt en in andere experimenten.
- (ii) De aanwezigheid van GAGGTT/CTCAA in plaats van CAGCTG/GTCGAC, C/G in plaats van A/T tweemaal en GCAC/CGTG in plaats van TTCG/AAGC in *gusA*-intron. Na een nucleotidenblast, *in silico* translatie en alignering van aminozuursequenties, zoals beschreven in 2.1.2.13, werd besloten dat deze wijzigingen geen invloed zouden hebben op het correct functioneren van het reporter gen.

Er wordt dus verwacht dat deze gedetecteerde verschillen geen invloed zullen hebben op de expressie en de werking van alle componenten in de bekomen vector. De verschillen die gedetecteerd werden kunnen namelijk ook fouten zijn in de databank GENEious en niet in de aangemaakte sequenties. Finaal werd verdergewerkt met kolonie P2 en P3 voor de MARs-controlevector pCMPG7403 en met de kolonie S1 voor de MARs-vector pCMPG7404. Deze vectoren worden voorgesteld in Figuur 17.



Figuur 17 Voorstelling van de finale MARs-controlevector met *gusA*-intron, pCMPG7403 (A), en de finale MARs-vector met *gusA*-intron, pCMPG7404 (B). Beide vectoren bevatten als T-DNA een cassette voor geneticineresistentie pNOS-neo-tNOS en een cassette voor de expressie van een reporter gen pUBI-*gusA*-intron-tNOS. pCMPG7404 bevat daarenboven tabMARs aan weerszijden van RB en LB. Ook wordt de ligging weergegeven van primers (bruin) en restrictieplaatsen (zwart) gebruikt in de verificatiemethodes bij de aanmaak van pCMPG7403 en pCMPG7404.

3.1.3 Discussie

3.1.3.1 Succesvolle aanmaak van de finale MARs-(controle)-vector

Eerst werden de vectoren pCMPG7387 en pCMPG7388, resp. MARs-controlevector en MARs-vector, succesvol aangemaakt voor een eerste banaantransformatie. Nadien werden deze vectoren gecorrigeerd, aangezien ze geen intron bevatten in het reporter gen *gusA*. Op deze manier werden de vectoren pCMPG7403 en pCMPG7404, resp. MARs-controlevector en MARs-vector, succesvol aangemaakt voor een tweede banaantransformatie. De laatstgenoemde vectoren bevatten als T-

DNA een cassette voor geneticineresistentie *pNOS-neo-tNOS* en een cassette voor de expressie van een reporter gen *pUBI-gusA-intron-tNOS*. Bovendien bevat pCMPG7404 tabMARs aan weerszijden van RB en LB.

3.1.3.2 Kwaliteit van de bekomen vectorconstructen

Een eerste opmerking in verband met de bekomen vectorconstructen betreft de locatie van de promotor *pUBI* ten opzichte van de tabMARs. Er werd aangetoond dat een afstand van 2300 bp tussen promotor en MARs een negatief effect heeft op de transgenexpressie. Enerzijds werd het niveau van transgenexpressie verlaagd, anderzijds werd de variabiliteit van transgenexpressie verhoogd ten opzichte van constructen waarvan de promotor onmiddellijk naast een MAR-element gelegen was (Cheng *et al.*, 2001). In de constructen pCMPG7388 en pCMPG7404 is telkens de terminator *tNOS* van een gen onmiddellijk naast een tabMAR-element gelegen. Voor *pUBI* van *gus* betekent dit dat er een afstand van ongeveer 2000 bp is tussen het 3'-uiteinde van de promotor en de tabMARs. De promotor zelf is ook ongeveer 2000 bp lang. Deze afstand zou de positieve effecten van de tabMARs voor de transgenexpressie in *Musa spp.* negatief kunnen beïnvloeden.

Een tweede opmerking betreft de locatie van de *gusA-intron* en *neo* cassettes ten opzichte van de RB en de LB. Het wordt aangeraden de belangrijkste vectorcomponenten aan de RB plaatsen. Aan de LB wordt het T-DNA namelijk regelmatig getrunceerd bij planttransformaties met *A. tumefaciens* (Gheysen *et al.*, 1991) inclusief bij banaan (Pérez Hernández *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009). Enerzijds zou het dus beter zijn de *gusA-intron* cassette aan de RB te plaatsen in plaats van naast de LB, zoals nu het geval is bij alle bekomen vectorconstructen. Anderzijds, met de huidige vectoren gebeurt er een selectie voor intacte, niet LB-getrunceerde inserties wat ook voordelen biedt naar het functioneren van de tabMAR naast de LB.

Het is van belang bovenstaande opmerkingen te plaatsen in een praktische context. De keuze van de vectorcomponenten en hun plaatsing steunt op vectoren die reeds voorhanden waren in het labo. Hierbij tracht men ook de tijdsbesteding en de financiële kant van het kloneringswerk af te wegen aan de voor- en nadelen van bepaalde vectorcomponenten en hun plaats in de finale vector.

3.1.4 Doelstelling voor de MARs-vector met *rdr6*-‘hairpin’

In dit tweede gedeelte van het thesiswerk werden vectoren aangemaakt om de transgenexpressie in *Musa spp.* te optimaliseren via een tweede benadering. Hierbij werd getracht om de expressie van het gen coderend voor het RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6 (RDR6) te onderdrukken. Het enzym RDR6 speelt namelijk een sleutelrol in verschillende PTGS-wegen zoals S-PTGS, transitiveiteit, ta-siRNA en nat-siRNA (paragraaf 1.2.3). Er werd geopteerd om *rdr6*, ook *sgs2* genaamd, aan neerwaartse genregulatie te onderwerpen, aangezien bij *sgs2*-mutanten van *A. thaliana* een vier- tot zevenvoudige verhoging van het niveau van transgenexpressie werd vastgesteld ten opzichte van wild type planten. Bovendien werd een 60-voudige verhoging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd in *sgs2*-mutanten met MARs ten opzichte van wild type planten (Butaye *et al.*, 2004). Om dezelfde benadering in *Musa spp.* toe te passen, is het noodzakelijk zelf *sgs2*-mutanten aan te maken door een ‘hairpin’-construct voor *rdr6* aan te maken met als doelwitsequentie een deel van de *rdr6* sequentie. De *Musa spp.* *rdr6* sequentie is niet gekend, daarom werd het *rdr6* van *O. sativa* gebruikt vermits beide monocotylen zijn.

Er werd vertrokken van vectoren beschikbaar aan het CMPG-PFI die reeds gebruikt werden om een ‘hairpin’-construct voor *rdr6* van *Brassica* en *Arabidopsis* aan te maken (De Bolle, persoonlijke communicatie). Hierin werd een cassette aangemaakt met dit hairpinconstruct aangedreven door *penh35S* met TMV leidersequentie. De promotor *p35S* is de meest frequent gebruikte constitutieve promotor in zowel mono- als dicotylen. Dankzij de aanwezigheid van herhalingen van korte sequenties, wordt de activiteit van de promotor versterkt (Kay *et al.*, 1987; Mitsuhashi *et al.*, 1996). Bovendien zorgt de aanwezigheid van de TMV leidersequentie voor een bijkomende verhoging in promotoractiviteit, door de efficiëntie van transcriptie te verhogen (Dowson *et al.*, 1993). Deze *rdr6*-‘hairpin’-cassette zal uiteindelijk deel uitmaken van het T-DNA van de MARs-controlevector pCMPG7403 en de MARs-vector pCMPG7404.

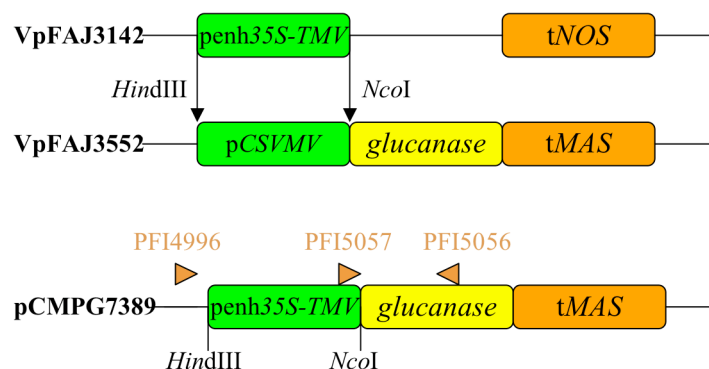
3.1.5 Kloneringsstrategie en resultaten voor de MARs-vector met *rdr6*-‘hairpin’

Voor dit kloneringswerk werd gebruikt gemaakt van één destinatevector: VpFAJ3552. Aan deze vector werden in drie stappen componenten verwisseld of toegevoegd afkomstig uit twee, reeds beschikbare, primaire vectoren: VpFAJ3142 en pCMVFL3. Vervolgens zal een gedeelte van de gemanipuleerde vector VpFAJ3552 geamplificeerd en overgebracht worden naar pCMPG7403 en pCMPG7404 voor de aanmaak van resp. de MARs-controlevector en MARs-vector met *rdr6*-

‘hairpin’. De belangrijkste componenten van zowel de destinatevector, als de primaire vectoren worden weergegeven in Tabellen 13 en 14 (paragraaf 2.1.2.15).

3.1.5.1 *VpFAJ3552-VpFAJ3142 = pCMPG7389*

In een eerste stap werd *pCSV MV* (‘cassava vein mosaic virus’ promotor) uit *VpFAJ3552* verwijderd door restrictie met *HindIII* en *NcoI* (Figuur 18), aangezien geen expressedata van deze promotor beschikbaar waren in *Musa spp.* Tezeldertijd werd *VpFAJ3142* geknipt met dezelfde restrictie-enzymen om *penh35S* eruit te halen, zoals beschreven in 2.1.2.3. Alle restrictieproducten werden op gel geplaatst, samen met de bijhorende originele, ongeknipte plasmideproducten als controle. Van het geknipt *VpFAJ3552* werd de band van 4137 bp die de vector zonder promotor vertegenwoordigt uit gel geïsoleerd, zoals beschreven in 2.1.2.7. Om zelfligatie te verhinderen, werd deze geknipte vector gedefosforyleerd, zoals beschreven in 2.1.2.8. Van het geknipt *VpFAJ3142* werd de band van 847 bp die de promotor *penh35S* vertegenwoordigt uit gel geïsoleerd. Nadien werd deze promotor geligeerd in de geknipte en gedefosforyleerde vector *VpFAJ3552*, zoals beschreven in 2.1.2.9. Op deze manier werd de intermediaire vector *VpFAJ3552-VpFAJ3142* of *pCMPG7389* gevormd. Tenslotte werd dit bekomen construct gebruikt om chemisch competente *E. coli*-cellen te transformeren, zoals beschreven in 2.1.2.11. De kolonies die overnacht opgroeiden werden via drie methodes gecontroleerd op de aanwezigheid van correcte finale vectoren: kolonie-PCR, ‘restrictiedigest’ en sequentiebepaling, zoals beschreven in respectievelijk 2.1.2.12, 2.1.2.3 en 2.1.2.13.



Figuur 18 Aanmaak intermediaire vector *VpFAJ3552-VpFAJ3142* of *pCMPG7389*. Door middel van restrictie met *HindIII* en *NcoI* wordt de promotor *penh35S-TMV* uit *VpFAJ3142* geknipt en zal de *pCSV MV* vervangen worden in *VpFAJ3552* wat resulteert in *pCMPG7389*. Ook wordt de ligging weergegeven van primers (bruin) en restrictieplaatsen (zwart) die gebruikt worden in de verificatiemethodes bij de aanmaak van *pCMPG7389*.

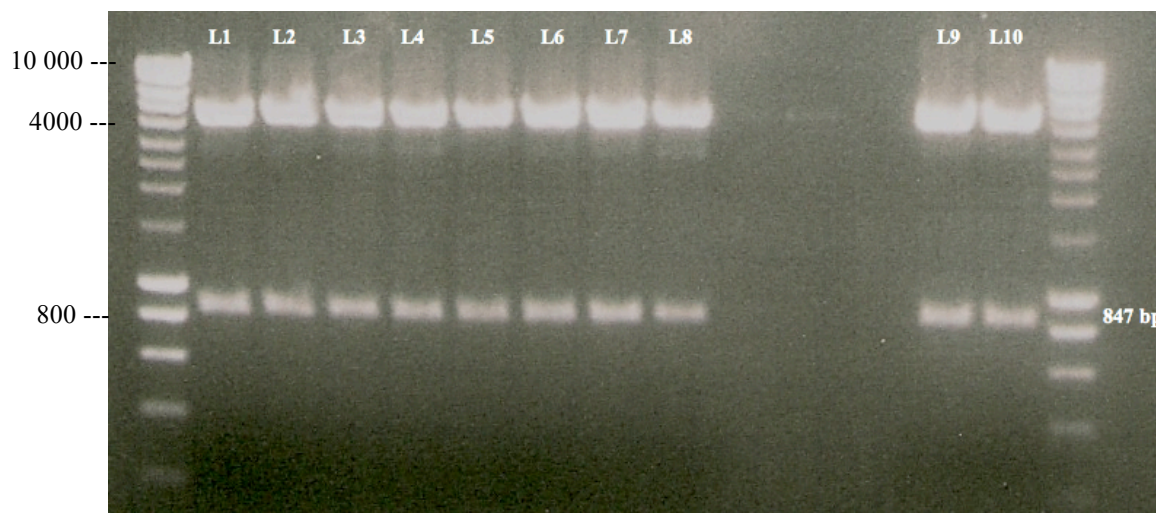
KOLONIE-PCR

De eerste verificatiemethode bestond uit een kolonie-PCR met één primerkoppel PFI5056-PFI5057. In het voorafgaand kloneringswerk werd namelijk gebruik gemaakt van twee restrictie-enzymen,

HindIII en *NcoI*, die verschillende overhangende uiteinden creëerden waardoor enkel unidirectionele klonering mogelijk is (Figuur 18). Indien *penh35S* op correcte wijze aanwezig was in het construct voor pCMPG7389, verscheen een band van ca. 700 bp. Bij alle kolonies werd een duidelijke band van ca. 700 bp gedetecteerd (data niet getoond).

RESTRICTIEDIGEST

De tweede verificatiemethode bestond uit een ‘restrictiedigest’ aan de hand van *HindIII* samen met *NcoI*, aangezien deze restrictie-enzymen ook gebruikt werden voor de aanmaak van pCMPG7389 (Figuur 18). De producten van de ‘restrictiedigest’ worden gevisualiseerd in Figuur 19. Indien *penh35S* succesvol uitgeknipt was, verscheen een band van 847 bp, die bij alle geselecteerde kolonies werd bekomen (Figuur 19). Vervolgens werden kolonies L6 en L7 geselecteerd voor een derde verificatie.



Figuur 19 ‘Restrictiedigest’ met *HindIII* en *NcoI* om na te gaan of het bekomen construct voor pCMPG7389 de promotor *penh35S* bevat. Op de foto van de producten van de ‘restrictiedigest’ wordt enerzijds een band van 847 bp verwacht voor *penh35S*. Anderzijds wordt daarbij een band van 4137 bp verwacht voor de rest van de vector. Legende: L= VpFAJ3552-VpFAJ3142= pCMPG7389, x= nummer van de geanalyseerde kolonie.

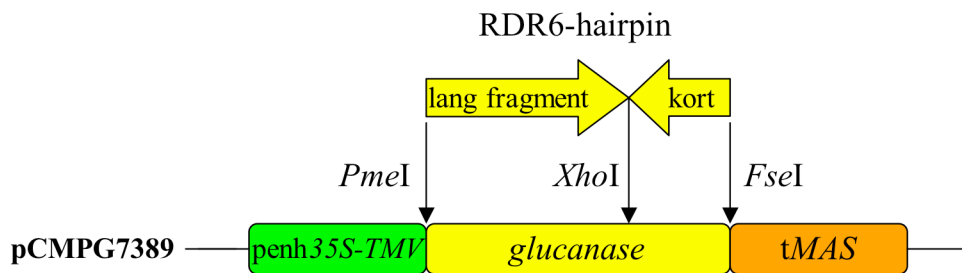
SEQUENTIEBEPALING

De derde verificatiemethode bestond uit een sequentiebepaling. Primers PFI4996 en PFI5057 werden gebruikt voor sequentiebepaling en *in silico* analyse, zoals beschreven in 2.1.2.13. De volledige sequentie van *penh35S* met overgangen naar flankerende sequenties werd in kaart gebracht. De gesequeneerde delen van L6 en L7 vertoonden ongeveer 98% overeenkomst met de verwachte sequentie voor *penh35S* in pCMPG7389. Volgende verschillen werden gedetecteerd ten opzichte van de verwachte sequentie voor pCMPG7389 die vooraf opgeslagen werd in de GENEious databank van het CMPG: tweemaal een deletie van A/T in *penh35S*. Na een nucleotidenblast werd besloten dat deze deleties geen invloed zouden hebben op de werking van de

promotor, aangezien vectoren met dezelfde sequentie als de aangemaakte constructen reeds succesvol werden gebruikt in andere *Arabidopsis*-transformatie-experimenten op het CMPG-PFI en in andere experimenten. Concluderend kan gesteld worden dat aanmaak van pCMPG7389, een intermediaire vector voor de aanmaak van ‘hairpin’-vectoren, succesvol was voor kolonies L6 en L7.

3.1.5.2 *rdr6*-‘hairpin’

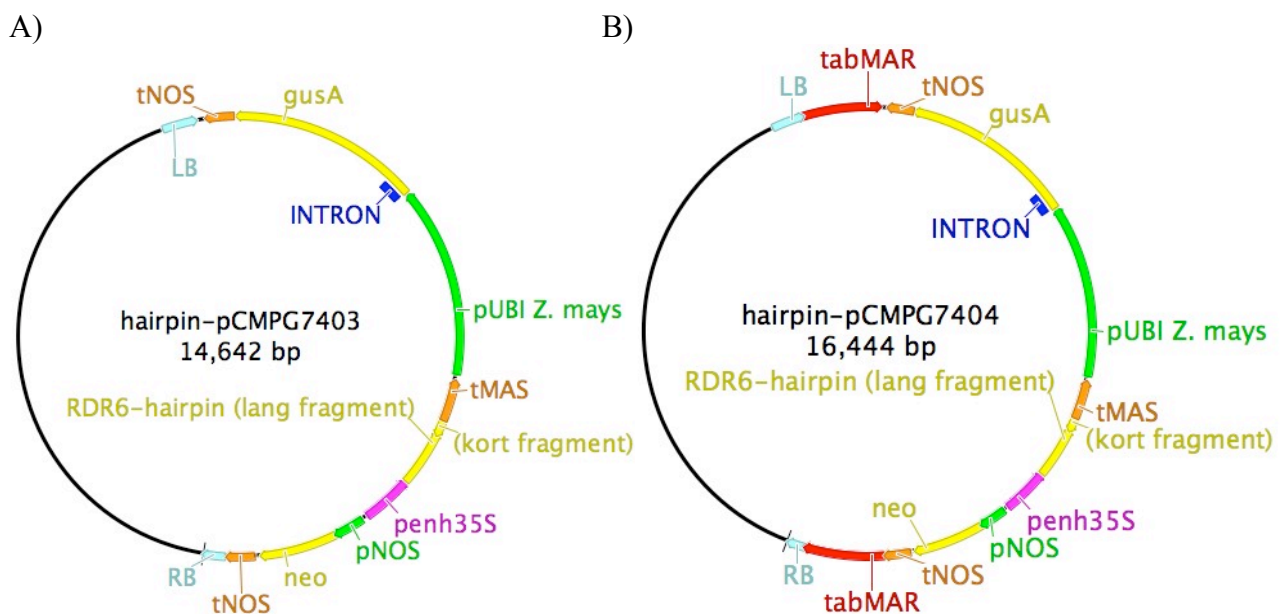
In een tweede stap werd de *rdr6*-‘hairpin’ geconstrueerd vertrekkend van pCMVFL3. Deze vector bevat het cDNA van het 3’ uiteinde van *rdr6* uit *O. sativa*. Er werd gekozen voor het 3’ uiteinde, aangezien met dit deel positieve resultaten bekomen werden bij gelijkaardig onderzoek in *Brassica* en *Arabidopsis* (De Bolle, persoonlijke communicatie). Ook werd vooraf een ‘blast’ uitgevoerd op eiwit- en nucleotideniveau met het 3’ uiteinde van *rdr6* in *Arabidopsis* en *O. sativa* om de gelijkenissen tussen deze sequenties te bestuderen. Enerzijds vormde dit 3’ uiteinde de matrijs voor de vorming van een kort fragment door PCR met primers PFI5015 (‘sense’) en PFI5048 (‘antisense’). Zij bevatten resp. een *FseI*- en *XhoI*- knipplaats. Anderzijds vormde dit de matrijs voor de vorming van een lang fragment met primers PFI5276 (‘sense’) en PFI5014 (‘antisense’). Zij bevatten resp. een *PmeI*- en *XhoI*-knipplaats. In bijlage wordt de sequentie voor *rdr6* met de aanduiding van het kort en lang fragment weergegeven. Deze fragmenten werden elk apart in een TOPO-vector geligeerd, zoals beschreven in 2.1.2 (data niet getoond). Eerst werd het korte fragment uit de TOPO-vector geknipt door de werking van *FseI* en *XhoI*. Tezelfdertijd werd het eerste deel van *glucanase* uit pCMPG7389 verwijderd door een partiële ‘restrictiedigest’ met *XhoI* en nadien een restrictie met *FseI*. De partiële ‘restrictiedigest’ werd uitgevoerd, aangezien *penh35S* ook een *XhoI*-knipplaats bevatte. In dit stadium van het kloneringswerk werd het praktisch werk voor deze thesis beëindigd. Vervolgens zal het korte fragment geligeerd worden in de partieel geknipte pCMPG7389-vector. Ten tweede zal het lange fragment uit de TOPO-vector geknipt worden door de werking van *PmeI* en *XhoI*. Tezelfdertijd zal het tweede deel van van *glucanase* uit pCMPG7389 verwijderd door een partiële ‘restrictiedigest’ met *XhoI* en nadien een restrictie met *PmeI*. Vervolgens zal het lange fragment geligeerd worden naast het korte fragment in de partieel geknipte pCMPG7389-vector. Dit wordt schematisch weergegeven in Figuur 20.



Figuur 20 Aanmaak van de intermediaire vector ‘hairpin’-pCMPG7389. Het kort en lang fragment van de *rdr6*-‘hairpin’ worden aangemaakt door een PCR met primers die uiteindelijk bevatten met resp. *XhoI-FseI* en *PmeI-XhoI* knipplaatsen. Vervolgens wordt het *glucanase* in pCMPG7389 vervangen door deze fragmenten door restrictie met resp. *XhoI-FseI* en *PmeI-XhoI*. Op deze manier wordt een cassette bekomen waarbij de *rdr6*-‘hairpin’ geflankeerd wordt door promotor *penh35S* en terminator *tMAS*.

3.1.5.3 ‘Hairpin’-pCMPG7404 en ‘hairpin’-pCMPG7403

In een derde stap zal de cassette *penh35S-rdr6*-‘hairpin’-*tMAS* geamplificeerd worden met primers die *I-PpoI* knipplaatsen bevatten. Na restrictie van het amplicon met de ‘hairpin’-cassette, pCMPG7403 en pCMPG7404 met *I-PpoI* kan de ‘hairpin’-cassette tussen de *gusA* reporter gen cassette en de cassette voor geneticineresistentie geïnsereerd worden. Op deze manier worden de finale MARs/*rdr6*-vector en controlevector bekomen, resp. ‘hairpin’-pCMPG7404 en ‘hairpin’-pCMPG7403. Deze finale vectoren worden voorgesteld in Figuur 21.



Figuur 21 Voorstelling van de finale MARs/*rdr6*-controlevector, ‘hairpin’-pCMPG7403 (A), en de finale MARs/*rdr6*-vector, pCMPG7404 (B). Beide vectoren werden nog niet aangemaakt en zullen als T-DNA drie cassettes bevatten: *pNOS-neo-tNOS* voor geneticineresistentie, *pUBI-gusA-intron-tNOS* voor de expressie van het reporter gen en *penh35S-rdr6*-‘hairpin’-*tMAS* voor de vorming van een ‘hairpin’ in het mRNA van een deel van *rdr6*. ‘Hairpin’-pCMPG7404 bevat daarenboven *tabMARs* aan weerszijden van *RB* en *LB*.

3.1.6 Discussie

3.1.6.1 Succesvolle aanmaak van een intermediaire 'hairpin'-vector

Er werd een intermediaire 'hairpin'-vector aangemaakt voor de neerwaartse regulering van *rdr6*: pCMPG7389. Deze vector bevat als belangrijkste componenten promotor *penh35S* en terminator *tMAS*. pCMPG7389 werd partieel geknipt en tegelijkertijd werd het kort fragment voor de aanmaak de *rdr6*-'hairpin' geamplificeerd. Dit kort fragment werd echter nog niet in de geknipte pCMPG7389-vector geligeerd.

3.1.6.2 Werkingsmechanisme: neerwaartse regulatie van *rdr6* via 'hairpin'

Om de discussie aan te vatten zal dieper ingegaan worden op het mechanisme en de gevolgen van de neerwaartse regulatie van *rdr6* door middel van een 'hairpin'-construct. Er wordt beroep gedaan op de IR-PTGS reactieweg (Figuur 6 A), aangezien gewerkt wordt met een 'hairpin'. Dit is een omgekeerde herhaling en vormt een 'trigger' voor IR-PTGS. Dit mechanisme werkt met een grotere efficiëntie dan S-PTGS (Figuur 6 B), daarom wordt verwacht dat *rdr6* sterk neerwaarts gereguleerd zal worden. Wanneer de 'hairpin' afgeschreven wordt, zullen dubbelstrengige transcripten met perfect complementaire armen gevormd worden, aangezien het korte en lange fragment waaruit de 'hairpin' bestaat binden met een lus. Vervolgens zal dit transcript verwerkt worden door twee DCL-enzymen voor de vorming van siRNA's van twee klassen (1.3.3.2). Uiteindelijk zal een RISC-complex met AGO1 de klieving van alle RNA homologe aan dat van de *rdr6*-'hairpin' sturen. Finaal leidt dit tot de degradatie van het mRNA van *rdr6* en alle RNA dat daaraan homologe is, zodat *rdr6* en haar homologen niet tot expressie kunnen komen. Zij worden neerwaarts gereguleerd.

Wanneer men de functie van RDR6 in verscheidene PTGS-mechanismen onderdrukt, zal waarschijnlijk niet enkel de transgenexpressie verhoogd worden. Vanuit fysiologisch standpunt wordt namelijk verwacht dat de mechanismen die instaan voor verdedigingsreacties, virusresistentie, natuurlijke ontwikkeling en genregulatie van de plant ook beïnvloed zullen worden, mogelijk op een negatieve manier. Vanuit biochemisch standpunt zou minder dsRNA gevormd worden. Dit geldt als een verzwakking van het amplificatiesignaal voor neerwaartse genregulatie. Bovendien kan uit minder dsRNA minder siRNA gevormd worden, waardoor de sequentiespecifieke afbraak van RNA door een RISC-complex met AGO1 minder frequent zal optreden. Uiteindelijk zou op deze manier de transgenexpressie verhoogd kunnen worden.

3.1.6.3 Kwaliteit van het gebruikte *rdr6*-‘hairpin’-construct

Er zijn verschillende manieren mogelijk om een ‘hairpin’ te maken en zij functioneren elk met een aparte efficiëntie om neerwaartse genregulatie te bewerkstelligen. Smith *et al.* (2000) beschrijven de efficiëntie van PTGS door allerhande ‘sense’-, ‘antisense’- en ‘hairpin’-constructen. Het blijkt dat de aanwezigheid van een intron tussen de ‘sense’ en ‘antisense’ arm van de ‘hairpin’ PTGS induceert met een efficiëntie van bijna 100%. Deze intronsequentie zou het DNA stabiliseren, maar wordt wel verwijderd gedurende de ‘processing’ van pre-mRNA. Uiteindelijk wordt dan ‘hairpin’-RNA gevormd dat geen lus bevat. De gebruikte *rdr6*-‘hairpin’ in deze thesis bevat echter wel een lus tussen de ‘sense’ en ‘antisense’ arm (Bijlage I). Een gelijkaardig construct als de *rdr6*-‘hairpin’ vertoonde een efficiëntie van 69% voor inductie van PTGS (Smith *et al.*, 2000). Uit deze experimentele bevindingen kan afgeleid worden dat de efficiëntie van inductie voor neerwaartse genregulatie van het *rdr6* verlaagd of verhoogd kan worden door het ‘hairpin’-construct aan te passen. Een verhoging van deze efficiëntie kan interessant zijn, wanneer er onvoldoende neerwaartse genregulatie optreedt om de transgenexpressie sterk te verhogen. Een verlaging van deze efficiëntie kan interessant zijn, wanneer neerwaartse genregulatie van het *rdr6* te sterke nefaste nevenwerkingen veroorzaakt in de normale fysiologie en genregulatie van de getransformeerde plant.

3.2 Analyse van de GUS-activiteit in *Musa spp.*

3.2.1 Doelstelling en experimenteel ontwerp: experiment 1 (pCMPG7387 en pCMPG7388)

Het doel van experiment 1 wordt omschreven als het testen van de effecten van tabMARs in embryogene suspensiecellen van *Musa spp.* na transformatie met de constructen pCMPG7388 (finale MARs-vector), pCMPG7387 (finale MARs-controlevector) en pLSKUL23 (positieve controlevector, *penh35S-gusA*-intron) zoals beschreven in 2.2.2.2. pLSKUL23 werd als positieve controlevector gekozen, omdat hiervan expressiedata beschikbaar waren uit vorige experimenten uitgevoerd aan het Laboratorium voor Tropische Plantenteelt. Er moet echter opgemerkt worden dat de vectoren pCMPG7388 en pCMPG7387 geen intron bevatten in het *gusA*-reportergen. Dit had als nadelig effect dat in de transiënte fase volgend op transformatie de gebruikte *A. tumefaciens* ook *gusA* tot expressie konden brengen. De afdoding van *A. tumefaciens* met timentin gebeurde namelijk pas na deze fase. In de histochemische en fluorometrische testen kon men dus niet enkel de *gusA*-expressie afkomstig van plantencellen detecteren, maar ook van resterende *Agrobacteria* en dit was niet onderscheidbaar. Daarom werd experimenteel onderzocht of de GUS-activiteit afkomstig van *A. tumefaciens* zou interfereren met de GUS-activiteit van de banaancellen in de fluorometrische testen van de transiënte fase. Hiervoor werden de twee *A. tumefaciens*-stammen met pCMPG7388 en pCMPG7387 opgegroeid en verdund tot OD 0,4, zoals voor een banaantransformatie (paragraaf 2.2.2.2). Eén ml verdunde bacteriën per herhaling en 6 herhalingen per vector werden bevroren in vloeibare stikstof en hierop werd een eiwitextractie uitgevoerd (paragraaf 2.3.2.1). Vervolgens werd ook een MUG-test uitgevoerd (paragraaf 2.3.2.2). Hoewel de eiwitextractie succesvol was, kon geen detecteerbare GUS-activiteit opgemeten worden voor deze stalen (data niet getoond). Dit wijst er dus op dat de gemeten GUS-activiteit afkomstig van de bananencellen niet beïnvloed zal worden door de GUS-activiteit uit *Agrobacteria*. Omwille van deze resultaten werd experiment 1 uitgevoerd.

In experiment 1 werd zowel het effect van tabMARs op het niveau, als op de variabiliteit van transgenexpressie nagegaan. Het niveau van transgenexpressie werd bepaald op basis van de gemiddelde GUS-activiteit (pmol MU/u x µg eiwit). De variabiliteit van transgenexpressie werd bepaald op basis van de variantie s^2 van de GUS-activiteit. Bovendien dient men op te merken dat de selectie en regeneratie via somatische embryogenese van transgene bananenlijnen een zes- tot negental maanden in beslag neemt. Omwille van deze lange periode werden in deze thesis de

effecten van tabMARS op het niveau van ongedifferentieerde celclusters onderzocht. Finaal is men geïnteresseerd om deze effecten te testen op het niveau van de uitgegroeide transgene planten.

Om bovenstaand doel te bereiken, werd beroep gedaan op twee eigenschappen van het *gusA* reportergensysteem. Enerzijds kunnen kwalitatieve data weergegeven worden, wanneer een histochemische kleuring uitgevoerd werd met 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) als substraat, zoals beschreven in 2.3.1. Het *gusA* gen codeert namelijk voor het enzym β -glucuronidase (GUS). Dit enzym splitst X-Gluc en na een oxidatieve dimerisatie kan een blauw-indigo product neerslaan. Anderzijds kunnen kwantitatieve data weergegeven worden, wanneer fluorometrische testen uitgevoerd werden met 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) als substraat, zoals beschreven in 2.3.2. Het enzym β -glucuronidase splitst namelijk ook MUG en zorgt voor de vrijgave van het fluorescente methylumbelliferone (MU) (Cervera, 2004). De transgenexpressie gemeten werd dus gemeten aan de hand van de activiteit van het enzym dat gecodeerd wordt door het reportergen *gusA*, niet op basis van de activiteit van het gen zelf. De resultaten van deze testen worden uiteengezet en bediscussieerd in resp. 3.2.2 en 3.2.3. Voor de fluorometrische testen werd een selectie gemaakt van de belangrijkste stalen (6 biologische herhalingen per vector) om de analyses binnen een aanvaardbare termijn af te ronden. Het experimenteel ontwerp van experiment 1 en een werkplanning wordt schematisch weergegeven in Tabel 17.

Tabel 17 Experimenteel ontwerp en werkplanning van experiment 1.

Vector	Transiënte fase		Stabiele fase	
	25/11/2010	6 d	85 d	125 d
	transformatie	start selectie	besmetting*	
Geen (negatieve controle, niet-getransformeerd)	24 stalen	8 verzameld (6 fluorometrisch + 2 histochemisch)	8 verzameld (6 fluorometrisch + 2 histochemisch)	6 verzameld (fluorometrisch)
pCMPG7387 (MARS-controlevector)	24	8	8	6
pCMPG7388 (MARS-vector)	24	8	8	6
pLSKUL23 (positieve controlevector)	24	8	8	6

d= dagen na transformatie, *: twaalf weken na transformatie werd een ongewenste, dubbele contaminatie gedetecteerd in ongeveer de helft van de stalen. Omwille van deze reden werden op dit tijdstip acht

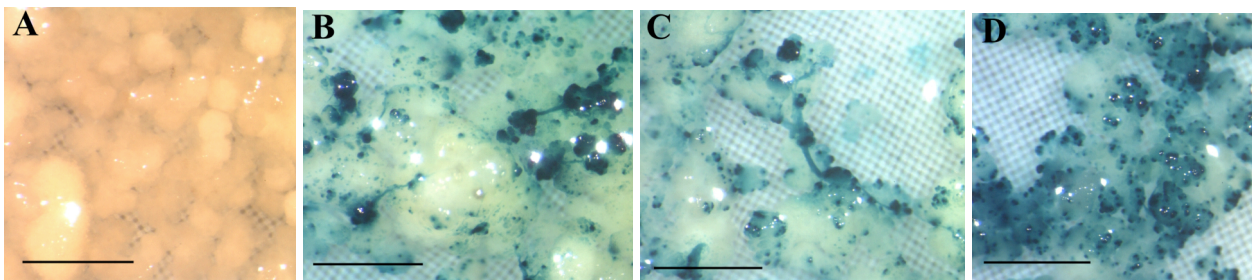
gecontamineerde stalen per vector verzameld en geanalyseerd analoog aan de transiënte fase. Bijna 18 weken na transformatie werden wel nog eens 6 stalen van de overgebleven niet-besmette stalen per vector verzameld voor fluorometrische analyse. Daarna werd experiment 1 stopgezet en werden bijgevoegde stalen bewaard om te laten uitgroeien tot een plant.

3.2.2 Resultaten: experiment 1

3.2.2.1 Kwalitatief: histochemische kleuring

In de transiënte fase werd een histochemische kleuring uitgevoerd op de stalen die getransformeerd werden met vectoren pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23 om de GUS-activiteit op een kwalitatieve manier na te gaan. Dit gebeurde tevens voor de negatieve controle die bestond uit ongetransformeerde suspensiecellen. Via microscopische analyse werden bij vectoren pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23 ontelbaar veel blauwe cellen en celclusters waargenomen. Bij de negatieve controles waren zoals verwacht geen blauwe cellen zichtbaar. Deze waarnemingen werden vastgelegd op foto's (Figuur 22).

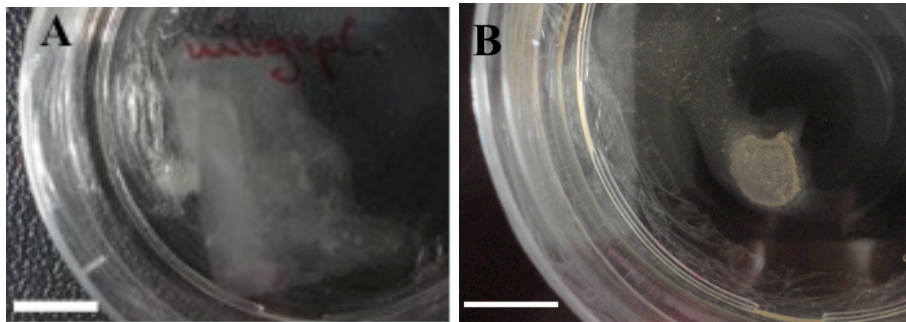
De gevolgen van de afwezigheid van een intron in het reporter-gen *gus* bij pCMPG7388 en pCMPG7387 zijn zichtbaar op de detailfoto's in Figuur 22 B en C. Bij de embryogene suspensiecellen getransformeerd met deze vectoren werd namelijk een biofilm van *A. tumefaciens* waargenomen die *gusA* tot expressie bracht en enzymactiviteit vertoonde. Deze biofilm was niet aanwezig bij de positieve controlevector die een *gusA*-intron bevatte (Figuur 22 D).



Figuur 22 Experiment 1: transiënte *gusA*-expressie in embryogene suspensiecellen van de bananencultivar 'Williams': ongetransformeerd (A) en getransformeerd via *A. tumefaciens* met vector (B) pCMPG7388, (C) pCMPG7387 en (D) pLSKUL23. Bij (B) en (C) zijn biofilms zichtbaar van *Agrobacterium* die *gusA*-expressie vertonen. Foto na co-cultivatie van 6 dagen na transformatie. Streep= 1mm.

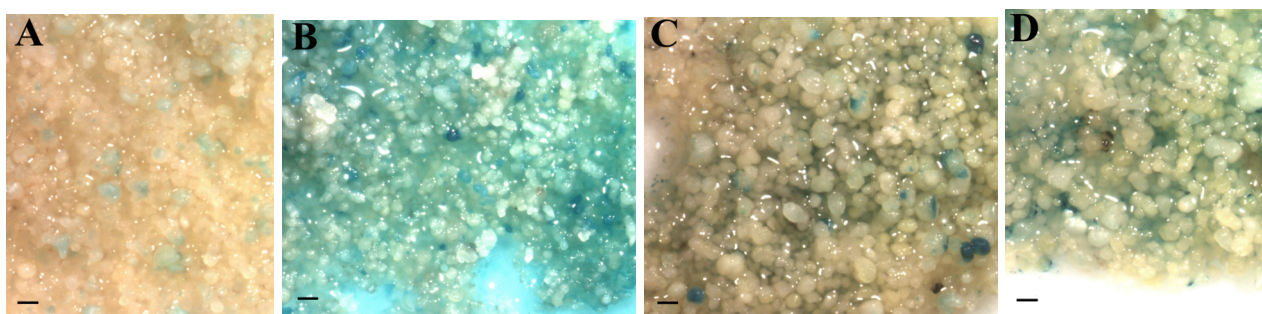
Twaalf weken na transformatie werden twee typen contaminaties gedetecteerd in ongeveer de helft van alle stalen. Enerzijds werd veelvuldig een grote melkachtige vlek waargenomen, zoals in Figuur 23 A getoond wordt. Anderzijds werd in slechts twee stalen een kleinere melkachtige vlek waargenomen met een lichtbruine, korrelige kern, zoals in Figuur 23 B getoond wordt. Deze laatste

contaminatie bleek een endogene besmetting te zijn aanwezig in de embryogene celsuspensies zelf. Door sequentieanalyse (16S rDNA) werd dit contaminerend organisme geïdentificeerd als een *Mycobacterium* sp. (Saskia Windelinckx, persoonlijke mededeling).



Figuur 23 De twee typen contaminaties op ZZ-medium 12 weken na transformatie, nadat de mesh met de embryogene suspensiecellen weggehaald werd. *A. tumefaciens* (A) manifesteerde zich als een grote melkachtige vlek. *Mycobacterium* sp. (B) manifesteerde zich als een kleinere melkachtige vlek met een denser, korreliger lichtbruin centrum met een diameter van ongeveer 1 cm. Streep= 1 cm.

De meest voorkomende contaminatie werd geïdentificeerd als *A. tumefaciens* (Figuur 23 A). Een histochemische kleuring werd uitgevoerd en hierop vallen zeer duidelijk de lichtblauwe vlekken in de negatieve controlestalen op (Figuur 24 A), alsook de blauwgekleurde achtergrondvloeistof bij stalen getransformeerd met pCMPG7388 (Figuur 24 B). Ook bij de pCMPG7387 en de pLSKUL23 stalen werden dezelfde lichtblauwe vlekken opgemerkt die duidelijk afwezig waren in de transiënte stalen (Figuur 24 C en D). Daarnaast werd een PCR-analyse uitgevoerd met *picA*-primers (Tabel 11) om de aanwezigheid van *Agrobacterium* te onderzoeken en met andere primers om de aanwezigheid van gebruikte constructen te bevestigen (data niet getoond). *PicA* codeert voor het polygalacturonase-achtig eiwit AAK90257. Er werd enkel een correct bandje gedetecteerd bij de PCR-producten met *picA*-primers, wat wijst op de aanwezigheid van *Agrobacterium*, maar niet de gebruikte vectoren. Echter, de blauwkleuring in de histochemische kleuringen kan enkel afkomstig zijn van constructen die *gusA* zonder intron bevatten.



Figuur 24 Besmette stalen met *A. tumefaciens* twaalf weken na transformatie. *GusA*-expressie in ‘Williams’ embryogene suspensiecellen: (A) ongetransformeerd en getransformeerd via *A. tumefaciens* met vector (B) pCMPG7388, (C) pCMPG7387 en (D) pLSKUL23. Streep= 1 mm.

Omwille van de onverklaarbare aanwezigheid van *A.tumefaciens* werden de verzamelde stalen van twaalf weken na transformatie niet meer geanalyseerd in fluorometrische testen. Wel werd verdergewerkt met de andere onbesmette stalen tot bijna 18 weken na transformatie. Nadien werd experiment 1 stopgezet. Indien in tussentijd nog contaminaties van *A. tumefaciens* gedetecteerd werden, werd 10 µl timentin (200 mg/l) over de besmette cellen verspreid om de bacterie af te doden.

3.2.2.2 Kwantitatief: GUS-activiteit

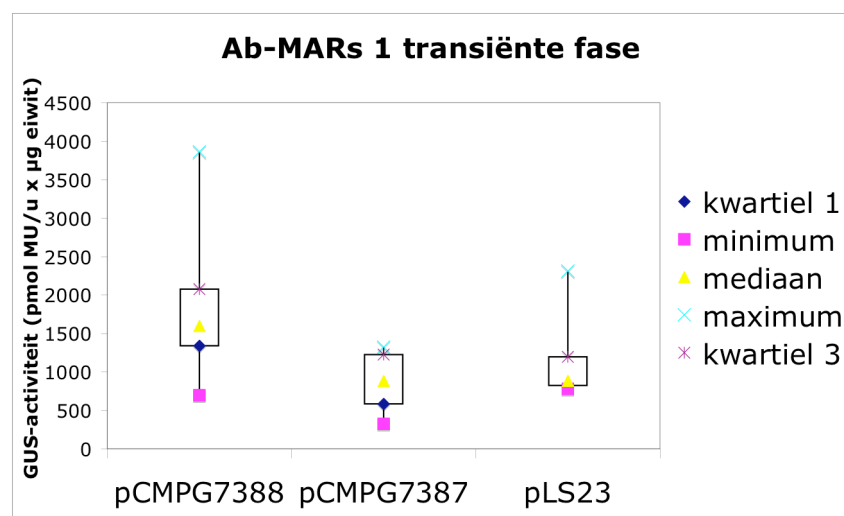
In de transiënte en stabiele fase werden voor telkens 6 stalen van constructen pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23 fluorometrische testen uitgevoerd om de GUS-activiteit op een kwantitatieve manier te bepalen. Vanuit een eerste perspectief werden de bekomen resultaten weergegeven aan de hand van de beschrijvende statistiek om bepaalde trends in de datasets te ontdekken. Vanuit een tweede perspectief werden teststatistieken gehanteerd om significante verschillen in de drie onderzochte groepen te detecteren. Er werd gebruik gemaakt van zowel parametrische, als niet-parametrische testen, zoals beargumenteerd in 2.4.3. De parametrische Tukey/Unequal HSD of Duncan's test werd gebruikt om significante verschillen te detecteren voor het niveau van transgenexpressie en de F-test voor de variabiliteit van transgenexpressie. De niet-parametrische Mann-Whitney test werd gebruikt om significante verschillen te detecteren voor zowel het niveau, als de variabiliteit van transgenexpressie. Er werden geen outliers verwijderd voor het toepassen van verschillende teststatistieken, aangezien slechts met maximaal 6 biologische herhalingen van elk construct werd gewerkt.

TRANSIËNTE FASE

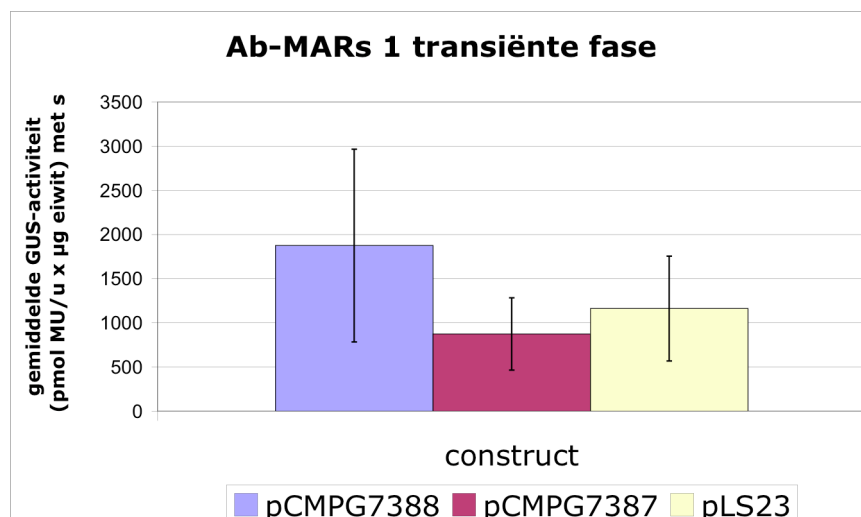
Om te beginnen werd de GUS-activiteit van de stalen in de transiënte fase geanalyseerd (Figuur 33 en Tabel 18). Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie opgemerkt dat de gemiddelde GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 2,1 keer hoger lag dan voor de celkolonies met pCMPG7387 (1874 vs. 873 pmol MU/u x µg eiwit). Ten tweede werd voor de variabiliteit van transgenexpressie opgemerkt dat de GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 7 keer hoger lag dan voor de celkolonies met pCMPG7387 ($s^2 = 1,19 \times 10^6$ vs. $1,68 \times 10^5$). De celkolonies getransformeerd met de positieve controle pLSKUL23 vertoonden een gemiddelde GUS-activiteit gelijkaardig aan de celkolonies met pCMPG7387. De variabiliteit van deze opgemeten GUS-activiteiten was echter 2 keer hoger dan voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7387.

In de boxplots werd ook duidelijk de spreiding van de meetgegevens per construct weergegeven (Figuur 25 A). Voor pCMPG7388 lagen de GUS-activiteiten het meest uiteen, voor pCMPG7387 het minst. De minimale en maximale GUS-activiteit die gedetecteerd kon worden voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 was resp. 697 en 3862 pmol MU/ u x µg eiwit. Voor kolonies getransformeerd met pCMPG7387 waren deze waarden resp. 326 en 1324 pmol MU/ u x µg eiwit. Aangezien de variabiliteit vaak groter is bij hogere populatiegemiddelden, vormt de CV een interessante spreidingsmaat voor populaties, zoals beschreven in 2.4.4. Voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 lag de CV 1,2 keer hoger dan met pCMPG7387 (58 % vs. 47%).

(A)



(B)



Figuur 25 Beschrijvende statistiek voor **experiment 1, transiënte fase**. A: boxplots voor vectoren pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23. De GUS-activiteit voor elk staal van de drie geanalyseerde vectoren is zichtbaar. B: gemiddelde GUS-activiteit en standaardafwijking s worden weergegeven voor de constructen pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23.

Vanuit een tweede perspectief werd nagegaan in hoeverre de gedetecteerde verschillen tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en pCMPG7387 significant waren, zoals weergegeven in Tabel 8. Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie een significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en pCMPG7387 volgens Duncan's test ($p= 0,031$) en Mann-Whitney's test ($p= 0,037$) en een niet significant verschil volgens Tukey's test ($p= 0,062$). Ten tweede werd voor de variabiliteit van transgenexpressie een significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en pCMPG7387 volgens Mann-Whitney's test ($p= 0,037$) en een niet significant verschil volgens de F-test ($p= 0,95$).

Tabel 18 Experiment 1, transiënte fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23.

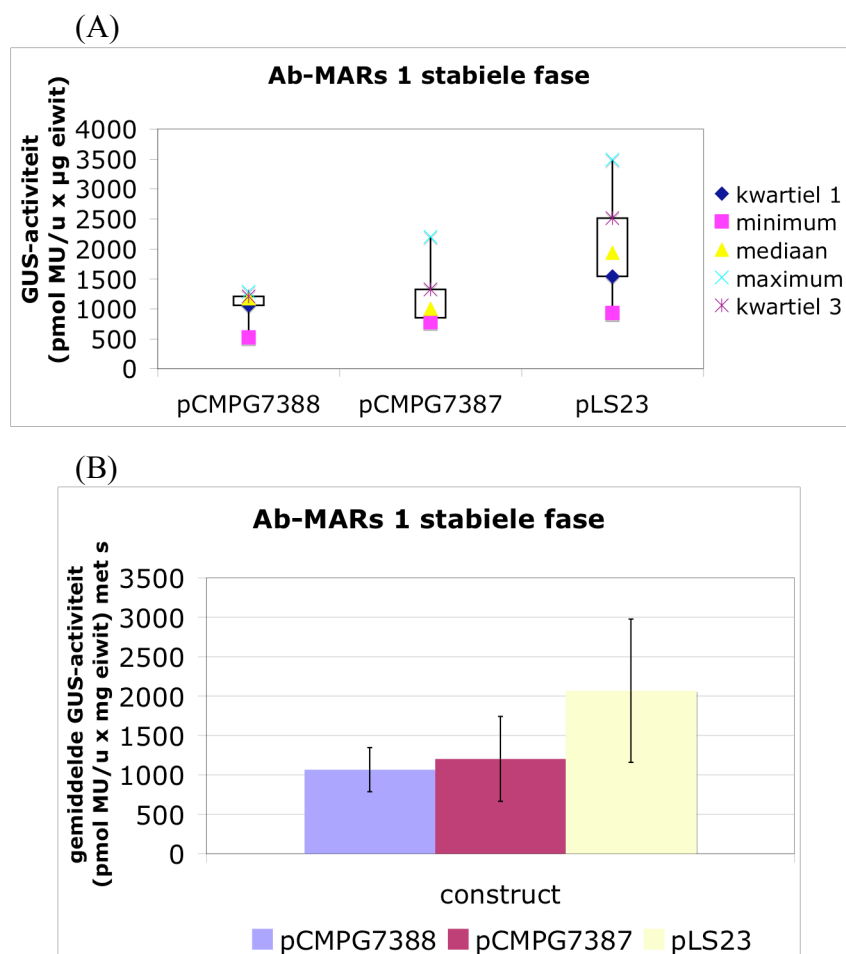
Vector	aantal stalen	gemiddelde ⁱ	med ⁱⁱ	s ⁱⁱⁱ	s ^{2iv}	CV ^v	T ^{vi*}	D ^{vii*}	F ^{viii*}	M ^{ix°}
pCMPG7388	6	1874	1599	1092	1,19x10 ⁶	58	a	a	a	a
pCMPG7387	6	873	883	410	1,68x10 ⁵	47	a	b	a	b
pLSKUL23	6	1161	885	593	3,52x10 ⁵	51	a	ab	a	ab

ⁱgemiddelde GUS-activiteit (pmol MU/ u x µg eiwit), ⁱⁱmediaan, ⁱⁱⁱstandaardafwijking, ^{iv}variantie, ^vcoëfficiënt van de variantie (%), ^{vi}Tukey's test, ^{vii}Duncan's test, ^{viii}F-test, ^{ix}Mann-Whitney's test, a>b>c: indien de gemiddelde GUS-activiteit van een geanalyseerd construct significant ($p < 0,05$) verschilt van een ander construct, dan worden beide constructen aangeduid door een verschillende letter, *In-getransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden, °ongetransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden.

STABIELE FASE

Om te vervolgen werd de GUS-activiteit van de stalen in de stabiele fase geanalyseerd (Figuur 26 en Tabel 19). Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie opgemerkt dat de gemiddelde GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 1,1 keer lager lag dan die van de celkolonies met pCMPG7387 (1067 vs. 1203 pmol MU/u x µg eiwit). Ten tweede wordt voor de variabiliteit van transgenexpressie opgemerkt dat de variantie van de GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 3,7 keer lager lag dan voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7387 ($s^2 = 7,80 \times 10^4$ vs. $2,89 \times 10^5$). De celkolonies getransformeerd met de positieve controle pLSKUL23 vertoonden een gemiddelde GUS-activiteit die 1,7 keer hoger was dan de celkolonies met pCMPG7387. De variabiliteit van deze opgemeten GUS-activiteiten was 2,8 keer hoger dan voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7387.

In de boxplots werd ook duidelijk de spreiding van de meetgegevens per construct weergegeven (Figuur 26 A). Voor pLSKUL23 lagen de GUS-activiteiten het meest uiteen, voor pCMPG7388 het minst. De minimale en maximale GUS-activiteit die gedetecteerd kon worden voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 was resp. 524 en 1285 pmol MU/u x μg eiwit. Voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7387 waren deze waarden resp. 852 en 2200 pmol MU/u x μg eiwit. Wat betreft de CV lag deze voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 1,7 keer lager dan met pCMPG7387 (26% vs. 45%).



Figuur 26 Beschrijvende statistiek voor **experiment 1, stabiele fase**. A: boxplots voor constructen pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23. De GUS-activiteit voor elk staal van de drie geanalyseerde constructen is zichtbaar. B: gemiddelde GUS-activiteit en standaardafwijking s worden weergegeven voor de constructen pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23.

Vanuit een tweede perspectief werd nagegaan in hoeverre de gedetecteerde verschillen tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en pCMPG7387 significant waren, zoals weergegeven wordt in Tabel 19. Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie een niet significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en

pCMPG7387 volgens Tukey's test ($p= 0,92$), Duncan's test ($p= 0,70$), Mann-Whitney's test ($p= 0,87$). Ten tweede werd ook voor de variabiliteit van transgenexpressie een niet significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388 en pCMPG7387 volgens Mann-Whitney's test ($p= 0,87$) en de F-test ($p=0,74$).

Tabel 19 Experiment 1, stabiele fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23.

Vector	aantal stalen	gemiddelde ⁱ	med ⁱⁱ	s ⁱⁱⁱ	s ^{2iv}	CV ^v	T ^{vi*}	D ^{vii*}	F ^{viii*}	M ^{ix°}
pCMPG7388	6	1067	1177	279	7,80x10 ⁴	26	b	b	a	b
pCMPG7387	6	1203	1003	538	2,89x10 ⁵	45	ab	ab	a	ab
pLSKUL23	6	2068	1936	908	8,24x10 ⁵	44	a	a	a	a

ⁱgemiddelde GUS-activiteit (pmol MU/ u x µg eiwit), ⁱⁱmediaan, ⁱⁱⁱstandaardafwijking, ^{iv}variantie, ^vcoëfficiënt van de variantie (%), ^{vi}Tukey's test, ^{vii}Duncan's test, ^{viii}F-test, ^{ix}Mann-Whitney's test, a>b>c: indien de gemiddelde GUS-activiteit van een geanalyseerd construct significant ($p < 0,05$) verschilt van een ander construct, dan worden beide constructen aangeduid door een verschillende letter, *In-getransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden, °ongetransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden.

3.2.3 Doelstelling en experimenteel ontwerp: experiment 2 (pCMPG7403 en pCMPG7404)

Het doel van experiment 2 wordt omschreven als het testen van de effecten van tabMARs in embryogene suspensiecellen van *Musa spp.* na transformatie met de constructen pCMPG7404 (finale MARs-vector), pCMPG7403 (finale MARs-controlevector) en pETKUL19 (positieve controlevector), zoals beschreven in 2.2.2.2. pETKUL19 werd als positieve controlevector gekozen, aangezien deze vector exact hetzelfde *pUBI-gusA-intron* bevat als pCMPG7404 en pCMPG7403. Men kon het effect van de tabMARs op zowel het niveau, als op de variabiliteit van transgenexpressie nagaan, op basis van de gemiddelde GUS-activiteit en de variantie van de GUS-activiteit van getransformeerde celkolonies resp. Analoog aan experiment 1 wordt opgemerkt dat in deze thesis de effecten van tabMARs op het niveau van celclusters onderzocht werd. Finaal is men geïnteresseerd om deze effecten te testen op het niveau van de uitgegroeide transgene plant.

De proefopzet van experiment 2 was analoog aan experiment 1. Het fundamentele verschil met experiment 1 is dat de vectoren pCMPG7404 en pCMPG7403 wel een intron in het reporter gen *gusA* bevatten, zodat prokaryoten als *A. tumefaciens* het reporter gen niet tot expressie kunnen

brengen. De resultaten van de uitgevoerde testen worden uiteengezet en bediscussieerd in resp. 3.2.4 en 3.2.5. Voor de fluorometrische testen werd een selectie gemaakt van de belangrijkste stalen om de analyses binnen een aanvaardbare termijn af te ronden. Het experimenteel ontwerp van experiment 2 en een werkplanning wordt schematisch weergegeven in Tabel 20.

Tabel 20 Experimenteel ontwerp en werkplanning van experiment 2.

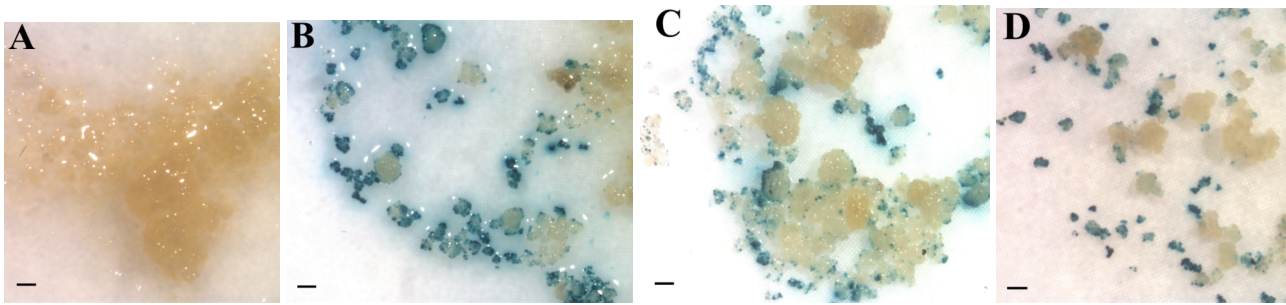
Vector	Transiënte fase		Stabiele fase		
	24/2/2011	6 d	11 d	34 d	...
	transformatie	start selectie			uitgroei tot plant
Geen (negatieve controle, niet-getransformeerd)	26 stalen	8 verzameld (6 fluorometrisch + 2 histochemisch)	6 verzameld (fluorometrisch)	6 verzameld (fluorometrisch)	6
pCMPG7403 (MARs- controlevector)	26	8	6	6	6
pCMPG7404 (MARs-vector)	26	8	6	6	6
pETKUL19 (positieve controlevector)	26	8	6	6	6

d= dagen na transformatie

3.2.4 Resultaten: experiment 2

3.2.4.1 Kwalitatief: histochemische kleuring

In de transiënte fase werd een histochemische kleuring uitgevoerd op de stalen die getransformeerd werden met constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19 om de GUS-activiteit op een kwalitatieve manier na te gaan. Dit gebeurde tevens voor de negatieve controle die bestond uit ongetransformeerde suspensiecellen. Via microscopische analyse werden bij constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19 ontelbaar veel blauwe cellen en celclusters waargenomen die afwezig waren bij de negatieve controles, zoals verwacht. Deze waarnemingen werden vastgelegd op foto's (Figuur 27). In tegenstelling tot experiment 1 werd ditmaal geen blauwkleuring gedetecteerd die afkomstig was van de gebruikte *A. tumefaciens*-stammen voor transformatie.



Figuur 27 Experiment 2: transiënte *gusA*-expressie in embryogene suspensiecellen van de bananencultivar ‘Williams’: (A) ongetransformeerd en getransformeerd via *A. tumefaciens* met vector (B) pCMPG7404, (C) pCMPG7403 en (D) pETKUL19. Foto na co-cultivatie van 6 dagen na transformatie. Streep= 1 mm.

3.2.4.2 Kwantitatief: *GUS*-activiteit

In de transiënte fase werden voor de stalen van constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19 fluorometrische testen uitgevoerd om de *GUS*-activiteit op een kwantitatieve manier te bepalen. Vanuit een eerste perspectief werden de bekomen resultaten weergegeven aan de hand van de beschrijvende statistiek om bepaalde trends in de datasets te ontdekken. Vanuit een tweede perspectief werden teststatistieken gehanteerd om significante verschillen in de drie onderzochte groepen te detecteren. Er werd gebruik gemaakt van zowel parametrische, als niet-parametrische testen zoals beargumenteerd in 2.4.3. De parametrische Unequal HSD of Duncan test werd gebruikt om significante verschillen te detecteren voor het niveau van transgenexpressie en F-test voor de variabiliteit van transgenexpressie. De niet-parametrische Mann-Whitney test werd gebruikt om significante verschillen te detecteren voor zowel het niveau, als de variabiliteit van transgenexpressie. Er werden geen outliers verwijderd voor het toepassen van verschillende teststatistieken, aangezien slechts met maximaal 6 biologische herhalingen van elk construct werd gewerkt.

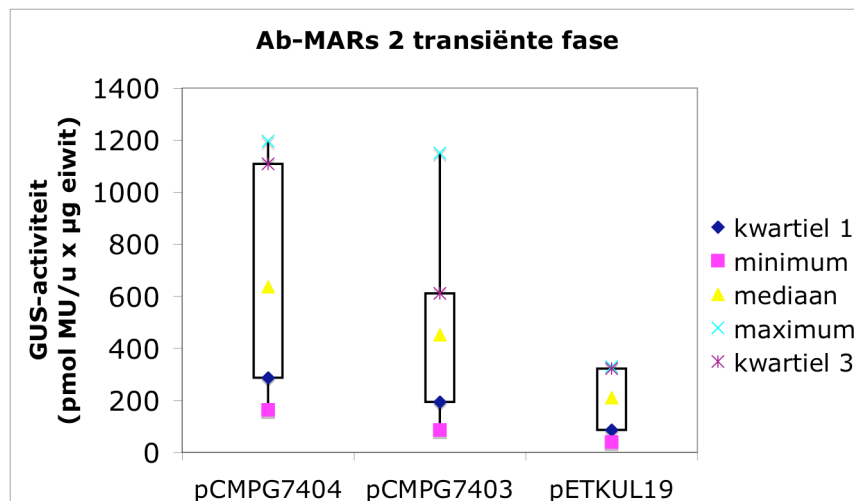
TRANSIËNTE FASE

Om te beginnen wordt de *GUS*-activiteit van de stalen in de transiënte fase geanalyseerd (Figuur 28 en Tabel 21). Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie opgemerkt dat de gemiddelde *GUS*-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 1,4 keer hoger lag dan voor de celkolonies met pCMPG7403 (678 vs. 499 pmol MU/u x µg eiwit). Ten tweede werd voor de variabiliteit van transgenexpressie opgemerkt dat deze 1,3 keer hoger lag voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 dan voor de celkolonies met pCMPG7403 ($s^2 = 2,23 \times 10^5$ vs. $1,76 \times 10^5$). De celkolonies getransformeerd met de positieve controle pETKUL19 vertoonden een gemiddelde *GUS*-activiteit die 2,5 keer lager dan voor de celkolonies met pCMPG7403. De

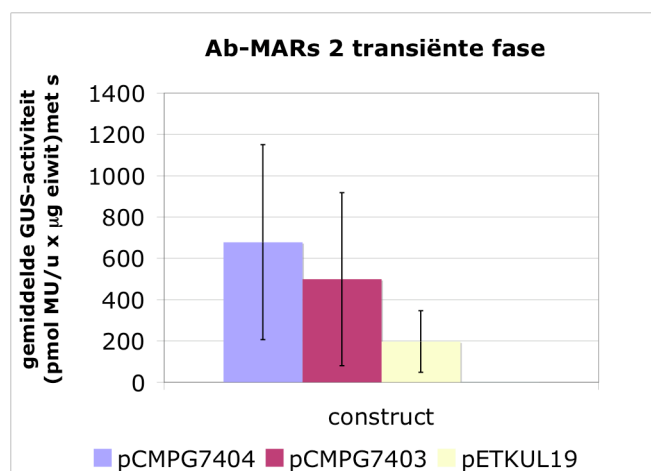
variabiliteit van deze opgemeten GUS-activiteiten was ook 7,8 keer lager voor de celkolonies getransformeerd met pETKUL19, dan voor pCMPG7403.

In de boxplots werd ook duidelijk de spreiding van de meetgegevens per construct weergegeven (Figuur 28 A). Voor pCMPG7404 en pCMPG7403 lagen de GUS-activiteiten het meest uiteen, voor pETKUL19 het minst. De minimale en maximale GUS-activiteit die gedetecteerd kon worden voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 was resp. 164 en 1196 pmol MU/ u x µg eiwit. Voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7403 waren deze waarden resp. 87 en 1159 pmol MU/ u x µg eiwit. Aangezien de variabiliteit vaak groter is bij hogere populatiegemiddelden, vormt de CV een interessante spreidingsmaat voor populaties, zoals beschreven in 2.4.4. Voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 lag de CV 1,2 keer lager dan met pCMPG7403 (70% vs. 84%).

(A)



(B)



Figuur 28 Beschrijvende statistiek voor **experiment 2, transiënte fase**. A: boxplots voor constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19. De GUS-activiteit voor elk staal van de drie geanalyseerde constructen is zichtbaar. B: gemiddelde GUS-activiteit en standaardafwijking s worden weergegeven voor de constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19.

Vanuit een tweede perspectief werd nagegaan in hoeverre de gedetecteerde verschillen tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 significant waren, zoals weergegeven wordt in Tabel 21. Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie een niet-significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 volgens Unequal HSD test ($p=0,76$), Duncan's test ($p=0,49$), Mann-Whitney's test ($p=0,47$). Ook voor de variabiliteit van transgenexpressie werd een niet significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 volgens Mann-Whitney's test ($p=0,47$) en de F-test ($p=0,71$).

Tabel 21 Experiment 2, transiënte fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19.

Vector	aantal stalen	gemiddelde ⁱ	med ⁱⁱ	s ⁱⁱⁱ	s ^{2iv}	CV ^v	U ^{vi*}	D ^{vii*}	F ^{viii*}	M ^{ix°}
pCMPG7404	6	678	637	472	2,22x10 ⁵	70	a	a	a	a
pCMPG7403	5	499	452	419	1,76x10 ⁵	84	a	a	a	a
pETKUL19	4	197	210	149	2,21x10 ⁴	75	a	a	a	a

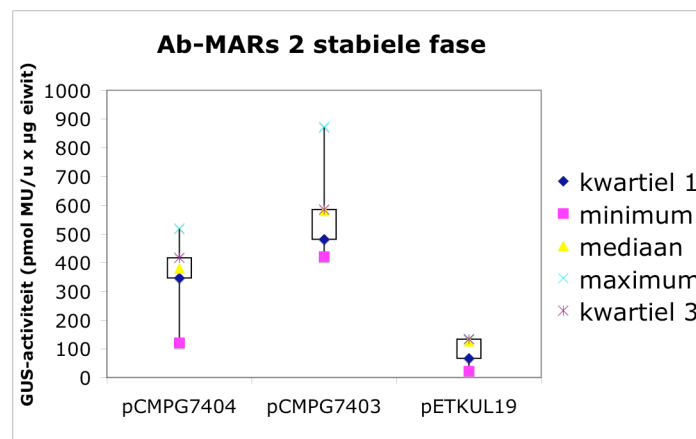
ⁱgemiddelde GUS-activiteit (pmol MU/ u x µg eiwit), ⁱⁱmediaan, ⁱⁱⁱstandaardafwijking, ^{iv}variantie, ^vcoëfficiënt van de variantie (%), ^{vi}Unequal HSD test, ^{vii}Duncan's test, ^{viii}F-test, ^{ix}Mann-Whitney's test, a>b>c: indien de gemiddelde GUS-activiteit van een geanalyseerd construct significant ($p < 0,05$) verschilt van een ander construct, dan worden beide constructen aangeduid door een verschillende letter, *In-getransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden, °ongetransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden.

STABIELE FASE

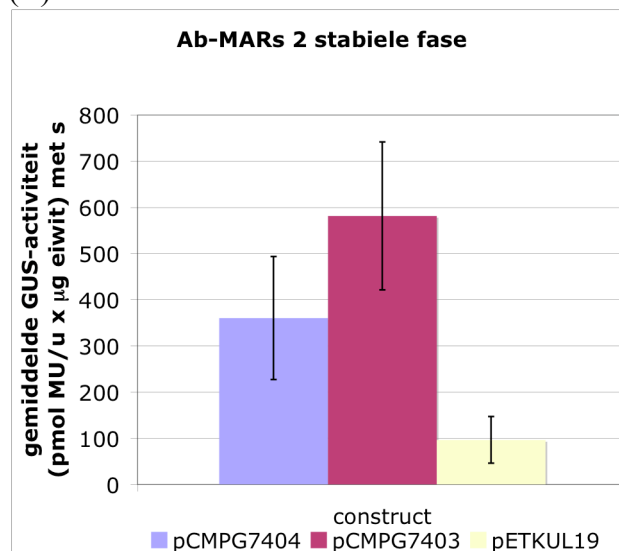
Om te vervolgen werd de GUS-activiteit van de stalen in de stabiele fase geanalyseerd (Figuur 29 en Tabel 22). Ten eerste wordt voor het niveau van transgenexpressie opgemerkt dat de gemiddelde GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 1,6 keer lager lag dan voor de celkolonies met pCMPG7403 (361 vs. 582 pmol MU/u x µg eiwit, resp.). Ten tweede wordt voor de variabiliteit van transgenexpressie opgemerkt dat de GUS-activiteit voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 1,4 keer lager lag dan voor de celkolonies met pCMPG7403 ($s^2 = 17\ 715$ vs. $25\ 642$, resp.). De celkolonies getransformeerd met de positieve controle pETKUL19 vertoonden een gemiddelde GUS-activiteit die 6 keer lager lag dan de celkolonies met pCMPG7403. De variabiliteit van deze opgemeten GUS-activiteiten was 10 keer lager dan voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7403.

In de boxplots werd ook duidelijk de spreiding van de meetgegevens per construct weergegeven (Figuur 29 A). Voor pCMPG7404 en pCMPG7403 lagen de GUS-activiteiten het meest uiteen, voor pETKUL19 het minst. De minimale en maximale GUS-activiteit die gedetecteerd kon worden voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 was resp. 120 en 519 pmol MU/ u x µg eiwit. Voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7403 waren deze waarden resp. 420 en 873 pmol MU/ u x µg eiwit. Wat betreft de CV ligt deze waarde voor celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 1,3 keer hoger dan met pCMPG7403 (37% vs. 28%).

(A)



(B)



Figuur 29 Beschrijvende statistiek voor **experiment 2, stabiele fase**. A: boxplots voor constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19. De GUS-activiteit voor elk staal van de drie geanalyseerde constructen is zichtbaar. B: gemiddelde GUS-activiteit en standaardafwijking worden weergegeven voor de constructen pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19.

Vanuit een tweede perspectief werd nagegaan in hoeverre de gedetecteerde verschillen tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 significant waren, zoals weergegeven in Tabel 22. Ten eerste werd voor het niveau van transgenexpressie een significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 volgens Unequal HSD test ($p=0,024$), Duncan's test ($p=0,012$) en Mann-Whitney's test ($p=0,016$). Ten tweede werd voor de variabiliteit van transgenexpressie een significant verschil opgemerkt tussen de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404 en pCMPG7403 volgens Mann-Whitney's test ($p=0,016$) en een niet significant verschil met de F-test ($p=0,69$).

Tabel 22 Experiment 2, stabiele fase: overzicht van de resultaten van de berekeningen en statistische testen voor de gemiddelde GUS-activiteit van celkolonies getransformeerd met pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19.

Vector	aantal stalen	gemiddelde ⁱ	med ⁱⁱ	s ⁱⁱⁱ	s ^{2iv}	CV ^v	U ^{vi*}	D ^{vii°}	F ^{viii°}	M ^{ix°}
pCMPG7404	6	361	380	133	1,77x10 ⁴	37	b	b	ab	b
pCMPG7403	6	582	581	160	2,56 x10 ⁴	28	a	a	a	a
pETKUL19	5	96	126	50	2,54 x10 ³	52	c	c	b	c

ⁱgemiddelde GUS-activiteit (pmol MU/ u x µg eiwit), ⁱⁱmediaan, ⁱⁱⁱstandaardafwijking, ^{iv}variantie, ^vcoëfficiënt van de variantie (%), ^{vi}Unequal HSD test, ^{vii}Duncan's test, ^{viii}F-test, ^{ix}Mann-Whitney's test, a>b>c: indien de gemiddelde GUS-activiteit van een geanalyseerd construct significant ($p < 0,05$) verschilt van een ander construct, dan worden beide constructen aangeduid door een verschillende letter, °ongetransformeerde gemiddelde GUS-activiteit gebruikt voor de berekening van de p-waarden.

3.2.5 Discussie

3.2.5.1 Succesvolle transformatie van embryogene celsuspensies van *Musa* spp.

In de histochemische testen voor de stalen van de transiënte fase werden voor pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23 (experiment 1) en voor pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19 (experiment 2) ontelbare blauwe cellen en celclusters gedetecteerd, terwijl op de negatieve controles geen enkele blauwkleuring zichtbaar was. Dit betekent dat de banaantransformaties succesvol waren. Ook bevestigt het eerdere transiënte *gusA*-expressieresultaten bekomen op het Laboratorium Tropische Plantenteelt met de *penh35S* promotor die in pLSKUL23 aanwezig is. In

de transiënte fase is nog niet alle transgeen DNA geïntegreerd in het genoom van de getransformeerde cellen en werd de selectie van transgene celkolonies met de gepaste antibiotica nog niet gestart. In deze fase werden dus potentieel transgene celkolonies blauwgekleurd.

Hierbij komt echter dat *A. tumefaciens* met vectoren pCMPG7388 en pCMPG7387 ook voor blauwkleuring konden zorgen in experiment 1 (3.1.2.2). De blauwkleuring afkomstig van bananencellen of *Agrobacteria* was moeilijk te onderscheiden, hoewel de blauwkleuring afkomstig van *A. tumefaciens* zichtbaar was via de biofilms die gevormd werden rond de bananencellen.

3.2.5.2 *Transiënte fase: in de MAR-populatie werd het niveau van transgenexpressie verhoogd, maar de variabiliteit niet verlaagd*

In de fluorometrische testen voor de stalen van de transiënte fase werd de GUS-activiteit bepaald voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7388, pCMPG7387 en pLSKUL23 (experiment 1) en voor de celkolonies getransformeerd met pCMPG7404, pCMPG7403 en pETKUL19 (experiment 2). Aangezien bij experiment 1 een intron ontbrak in het reportergen *gusA* bij pCMPG7388 en pCMPG7387, werd aangetoond via fluorometrische testen dat de GUS-activiteit van *A. tumefaciens* (OD 0,4) te laag was om te detecteren. Daardoor zou deze GUS-activiteit niet interfereren met de GUS-activiteit afkomstig uit getransformeerde celkolonies en waren de resultaten bekomen in experiment 1 toch betrouwbaar.

Het niveau van transgenexpressie, gebaseerd op de gemiddelde GUS-activiteit, lag hoger in de MAR-populatie dan in de niet-MAR-populatie van embryogene celsuspensies van *Musa spp.*, zoals verwacht (Tabel 23). Bij experiment 1 werd namelijk een significante tweevoudige verhoging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie ($p < 0,05$). Bij experiment 2 werd een niet significante 1,4-voudige verhoging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd bij de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie.

De variabiliteit van transgenexpressie, gebaseerd op de variantie, lag hoger in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie (Tabel 23). Dit is in tegenstelling tot eerder gerapporteerde data waarbij MARs de variabiliteit van transgenexpressie verlagen (Mlynarova *et al.*, 1995). Bij experiment 1 werd namelijk een significante zevenvoudige verhoging van de variabiliteit van GUS-activiteit gedetecteerd in de MAR-populatie ($p < 0,05$). Bij experiment 2 werd een niet-significante 1,3-voudige verhoging van de variabiliteit opgemeten in de MAR-populatie. Wanneer de

variabiliteit gebaseerd werd op de CV, was de inter-transformanten variabiliteit echter gelijkaardig in de MAR-populatie en de niet-MAR populatie. Bij experiment 1 werd namelijk een 1,2-voudige verhoging van de variabiliteit vastgesteld in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie. Bij experiment 2 was dit een 1,2-voudige verlaging.

Tabel 23 Overzicht van de bekomen resultaten in fluorometrische testen voor experiment 1 en 2.

		Experiment 1	Experiment 2
Transiënte fase	<i>niveau</i> van transgenexpressie	<u>2,1 x ↗*</u>	<u>1,4 x ↗</u>
	<i>variabiliteit</i> van transgenexpressie	7 x ↗*	1,3 x ↗
Stabiele fase	<i>niveau</i> van transgenexpressie	1,1 x ↘	1,6 x ↘*
	<i>variabiliteit</i> van transgenexpressie	<u>3,7 x ↘</u>	<u>1,4 x ↘*</u>

Gewenste resultaten zijn onderlijnd. *= significant verschil

3.2.5.3 Stabiele fase: in de MAR-populatie werd het niveau van transgenexpressie niet verhoogd en de variabiliteit licht verlaagd

Vlak voor de derde subcultuur werd opgemerkt dat de stalen van pETKUL19 (positieve controle van experiment 2) opvallend meer necrose vertoonden dan alle andere stalen (data niet getoond). Dit kan verklaren waarom de opgemeten GUS-activiteiten bij pETKUL19 duidelijk lager lagen dan bij de andere gebruikte vectoren. Hierdoor werd besloten rekening te houden met deze waarden.

Het niveau van transgenexpressie, gebaseerd op de gemiddelde GUS-activiteit, was ongeveer gelijk of lager in de MAR-populatie dan in de niet-MAR-populatie van embryogene celsuspensies van *Musa spp.*, in tegenstelling tot wat verwacht werd (Tabel 23). Bij experiment 1 werd namelijk een niet significante 1,1-voudige verlaging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie. Bij experiment 2 werd zelfs een significante 1,6-voudige verlaging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie ($p < 0,05$).

De variabiliteit van transgenexpressie, gebaseerd op de variantie, werd verlaagd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie, zoals verwacht. Bij experiment 1 werd namelijk

een niet-significante 3,7-voudige verlaging van de variabiliteit opgemeten. Bij experiment 2 werd een significante 1,4-voudige verlaging van de variabiliteit opgemeten ($p < 0,05$). Wanneer de variabiliteit gebaseerd werd op de CV, was reductie van de inter-transformanten variabiliteit kleiner dan wanneer de varianties in rekening gebracht werden in experiment 1. Er werd namelijk een 1,7-voudige verlaging van de variabiliteit gedetecteerd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie. Bij experiment 2 werd de inter-transformanten variabiliteit echter niet gereduceerd, wanneer de CV in rekening gebracht werd. Er werd namelijk een 1,3-voudige verhoging gedetecteerd in de MAR-populatie ten opzichte van de niet-MAR-populatie

3.2.5.4 Kwaliteit van de proefopzet

Een eerste opmerking in verband met de bekomen resultaten situeert zich bij het **plantstadium** waarin het onderzoek uitgevoerd werd. De effecten van tabMARs werden in embryogene suspensiecellen en celkolonies onderzocht. Dit zijn nog niet gedifferentieerde culturen zijn. In deze fasen bestaat een staal uit zowel transgen als niet-transgene en zowel dode, necrotische als levende cellen. Bovendien bevat ieder staal verschillende onafhankelijke transgene ‘events’. Men werkt dus met ‘gepoolde’ stalen waarin de effecten van MARs afgevlakt kunnen worden. Het is duidelijk dat de resultaten bekomen op het stabiel getransformeerde niveau van celkolonies ook niet geëxtrapoleerd kunnen worden naar het gedifferentie plantniveau. Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is evenwel het bestuderen van de effecten van tabMARs in bananenplanten.

Een tweede opmerking in verband met de bekomen resultaten situeert zich bij de **steekproefgrootte**. Op het niveau van celclusters wordt slechts met een laag aantal herhalingen gewerkt, 6 biologische (‘gepoolde’) herhalingen per vector, omwille van praktische redenen. Hierdoor is het moeilijker betrouwbare besluiten te trekken met een zekere statistische significantie. Op het niveau van de plant kan echter met meerdere onafhankelijke lijnen gewerkt worden. Men streeft er namelijk naar om metingen uit te voeren op 12 à 20 onafhankelijke lijnen per vector. Een relatief hoog aantal biologische herhalingen is zeker noodzakelijk wanneer men een variabel fenomeen als transgenexpressie wil bestuderen en betrouwbare conclusies wenst te trekken uit de bekomen resultaten. Om de grootte van een steekproef te bepalen, kan een power-analyse uitgevoerd worden, maar deze grootte wordt sterk beïnvloed door de praktische haalbaarheid, *in casu* het grote vereiste onderhoudswerk voor de aanmaak en het aanhouden van transgene bananenlijnen.

Op basis van bovenstaande opmerkingen kan in deze fase van het onderzoek geen conclusie getrokken worden over de werking van tabMARs in *Musa spp.* De bevindingen vastgesteld in dit

thesiswerk mogen immers niet geëxtrapoleerd worden naar het plantniveau. Het is dus niet uitgesloten dat de tabMARS een significante verhoging van het niveau en een significante verlaging van de variabiliteit van transgenexpressie kunnen teweegbrengen in het plantstadium van banaan. Wanneer significante verschillen opgemerkt worden tussen MAR- en niet-MAR-transformanten voor de net genoemde effecten, betekent dit dat de gebruikte tabMARS goed functioneren in *Musa spp.* en zij de transgenexpressie kunnen optimaliseren. Wanneer echter geen significante verschillen opgemerkt worden tussen MAR- en niet-MAR-transformanten, wil dit niet automatisch zeggen dat de MARS-technologie niet werkt in banaan of dat de gebruikte tabMARS geen effecten zouden hebben in banaan. Een mogelijke verklaring voor de afwezigheid van positieve effecten is dat deze tabMARS zeer goed functioneren in banaan en daardoor het expressieniveau zodanig verhogen dat PTGS geïnduceerd wordt (Baulcombe *et al.*, 1999). Om dit na te gaan kan men het gehalte aan siRNA's meten, het kopij-aantal bepalen en integratiepatronen van het transgen bestuderen (Mlynarova *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2002). Een andere verklaring zou zijn dat de tabMARS die in deze thesis gehanteerd werden geen sterke bindingsaffiniteit vertonen met de nucleaire matrix van *Musa spp.* Om dit na te gaan worden in de volgende paragraaf een viertal methodes beschreven met een uitdieping omtrent hun mogelijkheden en limitaties.

3.2.5.5 *Kwaliteit van de gebruikte tabMARS*

Een *in vitro*-bindingstest vormt een eerste methode die veelvuldig in de literatuur beschreven wordt om dit te verifiëren. Voordat de effecten van bepaalde MARS bestudeerd worden in een bepaalde plant, wordt gecontroleerd of deze MARS een sterke bindingsaffiniteit hebben met de nucleaire matrix van die plant (Mlynarova *et al.*, 1994; Ülker *et al.*, 1999; Michalowski *et al.*, 1999; Bode *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2002; Brouwer *et al.*, 2002; Holmes-Davis *et al.*, 2002; Sidorenko *et al.*, 2003; Mankin *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2005). In de meeste experimenten vertonen MARS met een sterke bindingsaffiniteit voor de nucleaire matrix van een bepaald plantenspecies ook positieve effecten op de transgenexpressie. Uitzonderingen zijn echter wel mogelijk. Zo werden sporadisch MARS gedetecteerd die wel sterk bonden aan de nucleaire matrix, maar die geen positief effect hadden op het niveau of de variabiliteit van transgenexpressie (Brouwer *et al.*, 2002; Tabel 1 op blz. 17). Ook werden sporadisch MARS gedetecteerd die niet sterk bonden aan de nucleaire matrix, maar die de transgenexpressie toch duidelijk konden optimaliseren (Mankin *et al.*, 2003; Tabel 1). De *in vitro*-bindingstest is dus de meest frequent uitgevoerde kwalitatieve test om de bindingsaffiniteit van bepaalde MARS aan de nucleaire matrix van een plant te controleren. (Bode *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2002; Brouwer *et al.*, 2002). Nadelig is dat een sterke bindingsaffiniteit

in vitro geen sluitende zekerheid geeft voor de bindingsaffiniteit van MARs aan de nucleaire matrix *in vivo*.

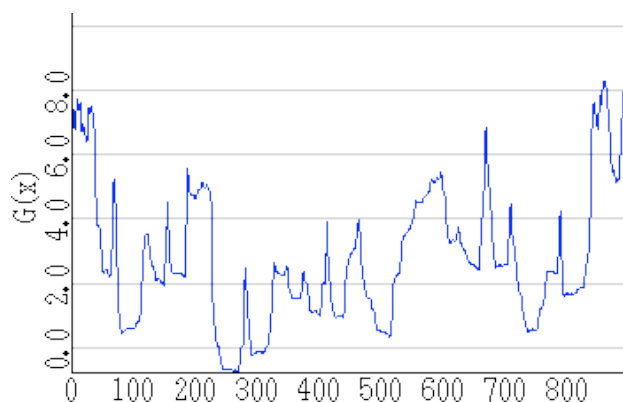
Er bestaat echter een tweede methode die de associatie- en integratiepatronen van MAR-elementen ten opzichte van de nucleaire matrix *in vivo* bestudeerd aan de hand van een tweekleurige Fluorescent *In Situ* Hybridisation (FISH) (Heng *et al.*, 2004). Voordelig is dat de lusvorming van het chromatine door MARs en andere eigenschappen in ‘real life’ onderzocht kunnen worden. Nadelig is dat deze methode nog maar zelden werd toegepast bij planten.

Een derde methode om de kwaliteit van MARs te controleren is een *in silico*-test die de aanwezigheid van bepaalde karakteristieke motieven nagaat (www.futuresoft.org/MAR-Wiz en www.futuresoft.org/modules/MarFinder/index). Deze methode wordt frequent gebruikt in het onderzoek. Nadelig is dat slechts op basis van de aanwezigheid van enkele motieven zoals de ‘90% AT box’ een sterke correlatie met de bindingssterkte van MARs wordt gelegd (Michalowski *et al.*, 1999). Zoals eerder in de literatuurstudie beschreven werd, worden de bindingseigenschappen van MARs namelijk niet bepaald worden door de aanwezigheid van bepaalde motieven (Bode *et al.*, 2006).

Een vierde methode is tenslotte de methode gebaseerd op de ‘stress-geïnduceerde DNA-duplex destabilisatie-energie’ (SIDD) van MARs (Bode *et al.*, 2006) (<http://orange.genomecenter.ucdavis.edu/cgi-bin/benham/sidd.cgi>). Voordelig is dat dit een sterke kwantitatieve test is om het gemak van SIDD te associëren aan de bindingsactiviteit van MARs. Deze methode wordt nog zelden toegepast in het onderzoek omtrent MARs in planten. Nadelig is dat de nucleaire matrix van een plant niet in rekening gebracht wordt, zoals in een *in vitro*- of *in vivo*- bindingstest.

Uit de bespreking van bovenstaande methodes kan men afleiden dat het mogelijk is de proefopzet te verbeteren door de kwaliteit van de gebruikte tabMARs te testen. Deze elementen werden namelijk uit *N. tabacum* geïsoleerd aan de hand van primers die homoloog waren aan reeds gepubliceerde H9 MARs uit *N. tabacum* (Iglesias *et al.*, 1997) en vertoonden verschillen in nucleotidensequentie ten opzichte van hun origineel beoogde sequentie (Butaye, 2004). Voor de originele H9 MARs werd een succesvolle *in vitro*-bindingstest uitgevoerd. Voor de nieuw bekomen tabMARs werd geen *in vitro*-bindingstest uitgevoerd om de bindingscapaciteit met de nucleaire matrix van een plant te controleren, enkel de aanwezigheid van motieven werd *in silico* nagegaan (Butaye, 2004). Deze *in silico*-test werd veelvuldig gebruikt in het onderzoek, maar bleek later weinig betrouwbaar. Het

SIDD-profiel van de gebruikte tabMARs wordt in Figuur 37 weergegeven. Het SIDD-profiel van tabMARs vertoont minder diepe dalingen in vrije energie dan de H9 MARs (Figuur 3). Dat kan erop wijzen dat tabMARs een lagere bindingssterkte aan de nucleaire matrix hebben dan H9 MARs.



Figuur 30 Het ‘stress-induced DNA duplex destabilization’ (SIDD)-profiel van tabMARs uit *N. tabacum*. De x-as komt overeen met de lengte van de DNA-sequentie. De y-as geeft de vrije energie $G(x)$ weer die nodig is voor een volledige ontkoppeling van basepaar x , wanneer dit onder eenzelfde superhelische druk geplaatst wordt. Regio’s met een sterke destabilisatie komen overeen met sterke minima van vrije energie in het SIDD-profiel. Hoe sterker de daling in vrije energie, hoe hoger de bindingssterkte van MARs aan de nucleaire matrix (Bi en Benham, 2004).

3.2.5.6 Een blik op experimentele gegevens uit de literatuur

De effecten van MARs op de transgenexpressie werden nooit eerder nagegaan in *Musa spp.* In dit opzicht is het uitgevoerde onderzoek in deze thesis uniek. De effecten van de gebruikte tabMARs werden wel eerder nagegaan in *A. thaliana*. TabMARs vertoonden zowel bij de constructen met p35S-*gus* als pCAS-*gus* geen positief effect op de transgenexpressie in wild type planten (De Bolle *et al.*, 2003). Men kan zich hierbij afvragen of andere tabaksmARs als Rb7 en TM2 of P1-MARs uit sojaboon en *Adh1* 5'-MARs uit *Zea mays* geen betere kandidaten zijn voor het optimaliseren van transgenexpressie in monocotylen. Zoals in Tabel 1 overzichtelijk weergegeven wordt, hebben deze MARs namelijk al duidelijk positieve effecten teweeggebracht op de transgenexpressie van monocotyle planten als *O. sativa* (Vain *et al.*, 1999, Cheng *et al.*, 2001, Xue *et al.*, 2005), *Z. mays* (Sidorenko *et al.*, 2003) en *H. vulgare* (Petersen *et al.*, 2002). In *sgs2*-mutanten van *A. thaliana* werd echter wel een vijfvoudige verhoging van het niveau van transgenexpressie gedetecteerd met de tabMARs die ook gebruikt werden in deze thesis, maar geen verlaging van de variabiliteit (De Bolle *et al.*, 2007). Dit schept veelbelovende verwachtingen wanneer in het vervolgonderzoek van deze thesis de effecten van MARs in combinatie met de neerwaartse genregulatie van *rdr6* zullen bestudeerd worden.

4. Algemene bespreking en besluit

4.1 Hypothesen

Na het bestuderen van de effecten van ‘matrix attachment regions’ (MARs) afkomstig uit *N. tabacum* in monocotylen in Tabel 1 (blz. 17), kunnen op basis van experimentele data enkele hypothesen naar voren geschoven worden omtrent de optimalisatie van transgenexpressie in *Musa spp.* Ten eerste wordt verwacht dat de gebruikte tabMARs een 2- tot 10-voudige verhoging van het niveau van transgenexpressie zullen veroorzaken in planten van *Musa spp.* getransformeerd met *A. tumefaciens*. Ten tweede wordt verwacht dat de tabMARs geen invloed zullen hebben op de variabiliteit van transgenexpressie. Dit druist in tegen de theoretische verwachtingen van de effecten van MARs, maar het is een realistische verwachting wanneer de experimentele data in Tabel 1 bestudeerd worden. Ten derde wordt verwacht dat de transformatiefrequentie tweevoudig zal toenemen in aanwezigheid van de tabMARs, gebaseerd op Zhang *et al.* (2007). Ten vierde wordt verwacht dat de stijging in transgenexpressie rechtevenredig zal zijn met de stijging in het kopij-aantal tot een bepaalde grenswaarde gebaseerd op Vain *et al.* (1999).

Zoals uit de literatuur kan afgeleid worden, is de optimalisatie van transgenexpressie een complex verhaal met verschillende interactiepartners die op verschillende niveaus werken en samenwerken. De vraag is hoe groot en hoe invloedrijk de rol van MARs is ten opzichte van allerlei andere factoren aanwezig in de cel. Zij vormen namelijk zowel structurele als regulatorische eenheden in een netwerk dat gekenmerkt wordt door de aanwezigheid en de werking van zeer vele componenten op verschillende niveaus.

Na het analyseren van de resultaten in Butaye *et al.* (2004), kan een tweede reeks aan hypothesen naar voren geschoven worden omtrent de optimalisatie van de transgenexpressie in *Musa spp.* door de combinatie van tabMARs en neerwaartse genregulatie van het *rdr6*. Ten eerste wordt verwacht dat het niveau van transgenexpressie nog sterker verhoogd wordt dan wanneer enkel tabMARs gebruikt worden. Ten tweede wordt verwacht dat ook in deze condities de variabiliteit van transgenexpressie onveranderd blijft. Het reduceren van de variabiliteit van transgenexpressie blijft een uitdaging in de planttransformatietechnologie, ook wanneer men andere strategieën in de literatuur bestudeert.

4.2 Een verhelderende kijk op de resultaten?

Uit het complexe en inconsistente gedrag van MARs in experimenten voor fundamenteel onderzoek of eerder toepassingsgerichte doeleinden, vermoedt men sterk dat de beschikbare kennis omtrent de functies, werking en effecten van MARs onvolledig is. Naast de eerder vermelde beperkingen (3.2.5.5) bemoeilijkt dit de interpretatie van de resultaten en het opstellen van éénduidige hypothesen. MARs zouden volgende functies uitoefenen:

- (i) het verhogen van de transcriptionele activiteit als ‘enhancers’,
- (ii) het verbeteren van de integratie van transgenen,
- (iii) het verankeren van chromatinelussen aan de nucleaire matrix,
- (iv) het isoleren van transgenen.

4.2.1 Transiënte fase: tabMARs verhogen het niveau van transgenexpressie in celclusters van *Musa spp.* als ‘enhancer’

In de transiënte fase kan nagegaan worden of tabMARs fungeren als ‘enhancer’ van de transcriptie voor *gusA-intron*, in de suspensiecellen van banaan getransformeerd met (pCMPG7388 of) pCMPG7404. Op dat moment zijn de transgenen namelijk niet geïntegreerd in het genoom en kunnen functies (ii) tot (iv) nog niet (goed) uitgeoefend worden (Brouwer *et al.*, 2002; Mlynarova *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 2002). Wat betreft het niveau van de transgenexpressie, kon zowel voor experiment 1 als 2 een verhoging waargenomen worden bij de MAR-transformanten. Voor experiment 1 gaat het om een significante tweevoudige verhoging, voor experiment 2 een niet-significante verhoging van 1,4. Aangezien experiment 2 kan beschouwd worden als een (correctere) herhaling van experiment 1, vermoedt men sterk dat tabMARs in staat zijn het niveau van transgenexpressie te verhogen omwille van hun activiteit als ‘enhancer’. Dit wil dus zeggen dat de gedetecteerde effecten in de transiënte fase niet te wijten zijn aan de interactie van MARs met de nucleaire matrix na integratie van het gewenste T-DNA in het genoom van *Musa spp.*

Wat betreft de variabiliteit van de transgenexpressie, konden moeilijker éénduidige conclusies getrokken worden voor de MAR-transformanten. In experiment 1 werd namelijk een significante 7-voudige verhoging van de variabiliteit gedetecteerd op basis van de variantie, terwijl de CV slechts 1,2 keer steeg. In experiment 2 werd een niet-significante verhoging van 1,3 gedetecteerd op basis van de variantie, terwijl de CV echter wel 1,2 keer daalde. Deze daling in variabiliteit is te licht om te concluderen dat de variabiliteit gedaald zou zijn in de MAR-populatie.

Als besluit kan men stellen dat tabMARs in de transiënte fase van potentieel transgene celclusters van banaan:

- (i) het niveau van transgenexpressie bijna tweevoudig kunnen verhogen,
- (ii) de variabiliteit van transgenexpressie niet kunnen reduceren.

4.2.2 Stabiele fase: kunnen tabMARs de variabiliteit van transgenexpressie in celkolonies van *Musa spp.* reduceren?

In de stabiele fase kunnen de effecten van MARs op de transgenexpressie afkomstig zijn van de vele functies die ze kunnen uitoefenen. Bovendien worden de analyses uitgevoerd op celkolonies met een stabielere *GusA*-expressie. Wat betreft het niveau van transgenexpressie, kon geen significante verhoging bij de MAR-transformanten gedetecteerd worden. In experiment 1 werd namelijk een gelijkaardig niveau als bij de niet-MAR-transformanten gedetecteerd. In experiment 2 werd zelfs een 1,6-voudige verlaging opgemeten. Men kan zich daarbij afvragen of de gebruikte tabMARs wel een sterke bindingsaffiniteit hebben met de nucleaire matrix van *Musa spp.* Daarvoor kan een *in vitro*-bindingstest uitgevoerd worden (3.2.5.5). Uit de SIDD-profielen van de gebruikte tabMARs bleek reeds dat de bindingssterkte lager was dan reeds gekende tabMARs (3.2.5.5). Het is echter ook mogelijk dat tabMARs het niveau van transgenexpressie zodanig verhogen dat neerwaartse genregulatie optreedt.

Wat betreft de variabiliteit van transgenexpressie, konden moeilijker éénduidige conclusies getrokken worden, net als bij de transiënte fase. In experiment 1 werd namelijk een niet-significante 3,7-voudige verlaging gedetecteerd, terwijl de CV slechts 1,7 keer daalde. In experiment 2 werd een significante 1,4-voudige verlaging gedetecteerd, terwijl de CV 1,3 keer steeg. Het reduceren van de variabiliteit van transgenexpressie blijkt in de onderzochte fasen van de experimenten een heikel punt, zoals andere experimentele data in Tabel 1 bevestigen. Bepaalde trends doen vermoeden dat de variabiliteit gereduceerd kan worden in de MAR-populatie, maar het gedetecteerde significante verschil is zeer licht. Als besluit kan men stellen dat tabMARs in de stabiele fase van transgene celkolonies van banaan:

- (i) het niveau van transgenexpressie niet kunnen verhogen,
- (ii) de variabiliteit van transgenexpressie waarschijnlijk eerder niet reduceren.

4.3 Toekomstig onderzoek omtrent de optimalisatie van transgenexpressie in *Musa* spp.

In het vervolgonderzoek van experiment 2 zullen de celkolonies uitgroeien tot planten, wanneer ze gesubcultuurd worden voor verdere regeneratie. Vervolgens zullen op plantniveau een aantal testen uitgevoerd worden om de effecten van tabMARs op de transgenexpressie nauwkeurig te bestuderen. PCR-analyses en nadien Southern hybridisaties zullen op de uitgegroeide positieve scheuten uitgevoerd worden om resp. de aanwezigheid en het integratiepatroon van een transgen met kopij-aantal te bepalen. Bij de uitgegroeide planten zullen ook histochemische GUS-kleuringen en fluorometrische metingen uitgevoerd worden.

Aan de hand van deze testen kan niet enkel het effect van tabMARs op het niveau en de variabiliteit van transgenexpressie bestudeerd worden. Dankzij de Southern hybridisatie wordt het ook mogelijk na te gaan of tabMARs het aantal ‘single copy’ lijnen in een transgene banaanpopulatie verhogen en of ze de transgenexpressie rechtevenredig met het kopij-aantal verhogen. Bovendien is het mogelijk het effect van tabMARs op de transformatiefrequentie (het aantal onafhankelijke transgene lijnen per staal van 50 mg versgewicht banaancellen) te bestuderen.

Dezelfde experimentele procedure als voor de studie van de effecten van tabMARs ondernomen werd, zal ondernomen worden om de effecten van tabMARs te onderzoeken in mutanten van *Musa* spp. waarin *rdr6* neerwaarts gereguleerd is. Er wordt verwacht dat de transgenexpressie op deze manier nog verbeterd kan worden. Er wordt echter ook verwacht dat de neerwaartse regulatie van *het rdr6* nefaste gevolgen zal meebrengen voor de fysiologie en genregulatie van de plant. Bovendien is het complex om een transgeen ‘event’ te karakteriseren dat onderworpen is aan neerwaartse genregulatie, zeker aangezien RDR6 een breed werkingsdomein heeft. Als men de commercialisatie van transgene *Musa* spp. met een geoptimaliseerde transgenexpressie op het oog heeft, dragen de planten met enkel tabMARs bijgevolg de voorkeur.

4.4 Het potentieel van MARs in *Musa* spp.

MARs bewezen reeds hun nut in het verbeteren van de performantie van transgene, ziekteresistente planten (Levin *et al.*, 2005; Robertson, 2004; Deng *et al.*, 2008). Dit inspireert om de bestrijdingsstrategieën tegen geduchte schimmels van *Musa* spp. te verbeteren. Voornamelijk *Mycosphaerella fijiensis* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), veroorzakers van

respectievelijk ‘Black Sigatoka’ en ‘Panama Disease’, zorgen voor grote opbrengstverliezen in zowel de commerciële teelt van Cavendish bananen als de niet-commerciële teelt van een veelheid aan variëteiten door de kleine boer. Gecultiveerde bananen zijn vegetatief vermeerderde grassen en de meeste eetbare cultivars worden gekenmerkt door steriliteit en verschillende niveaus van ploïdie. Deze eigenschappen bemoeilijken het veredelingsproces voor het maken van nieuwe, ziekteresistente cultivars. Bovendien zijn de klassieke bestrijdingsmethoden met fungiciden milieuvervuilend, niet effectief tegen pathogenen die in de bodem huizen en niet toegankelijk voor kleine boeren (Sagi *et al.*, 1995). Daarom wordt duidelijk dat genetische transformatie belangrijk en noodzakelijk is om landbouwkundig interessante genen in te brengen in banaan en zodoende bedreigende schimmels op een duurzame manier te bestrijden (Huang *et al.*, 2007). Concreet zouden MARs de expressie van kandidaat resistentiegenen tegen schimmels (Remy *et al.*, 1998; Vishnevetsky *et al.*, 2010) kunnen verhogen in *Musa spp.*

Naast economisch getinte toepassingen van MARs, mag niet uit het oog verloren worden dat MARs ook interessant zijn voor onderzoekdoeleinden. Wanneer de te onderzoeken genen geflankeerd worden door MAR-elementen, voornamelijk kippenMARs (Mlynarova *et al.*, 1995; Mlynarova *et al.*, 1996), kunnen zij stabielere tot expressie komen en minder variabele effecten teweeg brengen. Deze stabielere resultaten kunnen vervolgens leiden tot het trekken van meer betrouwbare conclusies. Bijgevolg is er dan minder nood aan het screenen van een groot aantal transgene planten en dit is zeker voor het arbeidsintensieve onderhoud van banaan een groot praktisch voordeel.

4.5 *Besluit*

In deze thesis werden experimenten opgestart om de transgenexpressie in *Musa spp.* te optimaliseren. Vanuit theoretisch standpunt werden volgende doelstellingen beoogd:

- (i) de verhoging van het niveau van transgenexpressie,
- (ii) de verlaging van de variabiliteit van transgenexpressie.

Om deze doelstellingen te bereiken, werden twee benaderingen uitgewerkt. De eerste benadering betrof het gebruik van ‘**matrix attachment regions**’ of MARs. De tweede benadering, betrof het uitschakelen van het **RNA-afhankelijk RNA-polymerase 6** of RDR6.

Na de studie van experimentele data in verband met de effecten van MARs in allerlei mono- en dicotyle planten, konden de initiële doelstellingen genuanceerd en aangevuld worden. De nieuw

opgestelde hypothesen in verband met de effecten van tabMARs in *Musa spp.* werden geformuleerd als volgt:

- (i) tabMARs verhogen het niveau van transgenexpressie 2- tot 10-voudig
- (ii) tabMARs verlagen de variabiliteit van transgenexpressie niet
- (iii) tabMARs verhogen de transformatiefrequentie tweevoudig
- (iv) tabMARs veroorzaken een stijging in transgenexpressie rechtevenredig met de stijging van het kopij-aantal, tot aan een bepaalde grenswaarde
- (v) hypothese (i) zal versterkt worden wanneer MARs met de neerwaartse regulatie van *rdr6* gecombineerd worden

Vanuit experimenteel standpunt werden de effecten van tabMARs bestudeerd in suspensiecellen van banaancultivar 'Williams' (genoomgroep AAA, Cavendish banaan). Om te beginnen werden vectoren gemaakt om embryogene celsuspensies van banaan te transformeren. Enerzijds werd een MARs-vector, pCMPG7388 of pCMPG7404, gecreëerd die als T-DNA twee cassettes bevatte. De *pUBI-gusA-tNOS* cassette stond in voor de expressie van het reporter gen en de *pNOS-neo-tNOS* cassette stond in voor geneticineresistentie als plantselectiemerker. De linker- en rechtergrenssequentie werden elk geflankeerd door tabMARs. Anderzijds werd een MARs-controlevector gecreëerd, pCMPG7387 of pCMPG7403, die enkel verschild van de MARs-vector door de afwezigheid van tabMARs. Het verschil tussen de pCMPG738x-vectoren in experiment 1 en de pCMPG740x-vectoren in experiment 2 lag in de afwezigheid van een intron in het reporter gen *gusA* in eerstgenoemde. Dit zou betekenen dat de *Agrobacteria* gebruikt voor transformatie ook *gusA* tot expressie zouden kunnen brengen. Dit vormt voornamelijk een probleem in de transiënte fase van ca. zes dagen na transformatie tijdens de co-cultivatie, aangezien *A. tumefaciens* nog niet afgedood wordt door het antibioticum timentin. Op basis van enkele experimenten werd aangetoond dat de GUS-activiteit van deze *Agrobacteria* niet interfereert met de GUS-activiteit van de bananencellen, aangezien de hoeveelheid aan *A. tumefaciens* gebruikt voor transformatie onvoldoende hoog was om een detecteerbare GUS-activiteit op te meten. De resultaten uit experiment 1 konden met andere woorden toch gebruikt worden in verdere besprekingen.

Vervolgens werden getransformeerde suspensiecellen onderworpen aan een kwalitatieve en een kwantitatieve GUS-test in zowel de transiënte fase, als de latere stabiele fase wanneer niet-gedifferentieerde celkolonies zich vormen (4 maanden na transformatie voor experiment 1 en 1 maand na transformatie voor experiment 2). De histochemische GUS test bevestigde voor beide experimenten dat de banaantransformaties succesvol uitgevoerd werden. De fluorometrische GUS-

test. genereerde data voor de MAR-, niet-MAR-transformanten en de positieve controle die onderworpen werden aan statistische analyses

Het **niveau** van transgenexpressie werd bepaald aan de hand van de gemiddelde enzymatische GUS-activiteit van MAR-transformanten ten opzichte van niet-MAR-transformanten. In de transiënte fase werd een bijna tweevoudige verhoging gedetecteerd. Uit deze waarnemingen vermoedt men sterk dat tabMARs in staat zijn het niveau van transgenexpressie te verhogen in niet-gedifferentieerde bananencellen. Dit effect zouden ze kunnen bewerkstellingen omwille van hun functie als ‘enhancer’ die de transcriptionele activiteit van transgenen verhoogt. De andere drie functies van MARs worden namelijk nog niet uitgevoerd in de transiënte fase. De gedetecteerde effecten in deze fase zijn immers niet te wijten aan de interactie van MARs met de nucleaire matrix na integratie van het gewenste T-DNA in het genoom. In de stabiele fase van celkolonies werden nog geen gunstige effecten van MARs gedetecteerd. Uit deze waarnemingen kan men zich afvragen of de gebruikte tabMARs wel een sterke bindingsaffiniteit hebben met de nucleaire matrix van *Musa spp.* In de stabiele fase zouden namelijk alle functies van MARs actief moeten zijn en wordt verwacht dat MAR-elementen interageren met de nucleaire matrix. Een andere verklaring voor het wegblijven van gunstige effecten van MARs is dat de tabMARs het niveau van transgenexpressie zodanig verhoogden dat neerwaartse regulatie optrad.

De **variabiliteit** van transgenexpressie werd bepaald aan de hand van de variantie van de enzymatische GUS-activiteit van MAR-transformanten ten opzichte van niet-MAR-transformanten of aan de hand van de CV. Zowel in de transiënte, als de stabiele celkolonies konden moeilijk éénduidige conclusies getrokken worden voor de MAR-transformanten. Uit de waarnemingen vermoedt men dat tabMARs de variabiliteit van transgenexpressie niet reduceren in de transiënte fase en eerder niet reduceren in de latere fase. Het reduceren van de variabiliteit blijft een struikelblok bij de optimalisatie van transgenexpressie in de planttransformatietechnologie, ook wanneer andere benaderingen dan MARs gehanteerd worden.

Samenvattend kan gesteld worden dat tabMARs volgende gunstige effecten teweegbrengen voor de optimalisatie van transgenexpressie in niet-gedifferentieerde bananencellen:

- (i) een bijna tweevoudige verhoging van het niveau van transgenexpressie in de transiënte fase
- (ii) mogelijk geen reductie van de variabiliteit van transgenexpressie in transiënte en stabiele fase.

Er moet opgemerkt worden dat het complex is om de effecten van MARs te bestuderen, wetende dat de functies en de werking van MARs nog niet volledig opgehelderd zijn. Daarbij komt dat de conclusies met een beperkte statistische zekerheid getrokken werden, aangezien op het niveau van suspensiecellen en celkolonies maar met een relatief laag aantal biologische herhalingen gewerkt kan worden. Bovendien konden de effecten van tabMARs op de transgenexpressie nog niet in geregenereerde bananenplanten bestudeerd worden. Extrapolatie van de resultaten bekomen tijdens de eerdere ontwikkelingsstadia kan niet.

Referentielijst

- Abranches, R., Shultz, R.W., Thompson, W., Allen, G.C.** (2005a). Matrix attachment regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression. *Plant Biotechnol J*, 3: 535-543.
- Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P. en Stoger., E.** (2005b). Review Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *J Biotechnol*, 120: 121–134.
- Allen, G.C., Hall, G.E., Jr., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A.K. en Thompson, W.F.** (1996). High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell*, 8: 899–913.
- Allen, G.C., Spiker, S., en Thompson, W.F.** (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol*, 43: 361-376.
- Allen, G.C.** (2008). The Role of Nuclear Matrix Attachment Regions in Plants. In: Functional organisation of the plant nucleus. I. Meier (eds.), Springer, Berlin Heidelberg. p 1-29.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S. en White, W.** (2008). Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot*, 59: 3551–3562.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. en Vance, V.B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13079–13084.
- Arinaitwe, G.,** (2008). An improved Agrobacterium-mediated transformation method for banana and plantain (*Musa spp.*). Dissertationes de Agricultura. Doctoraatsproefschrift 781. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 156 p.
- Ascenzi, R., Ingram, J.L., Massel, M., Thompson, W.F., Spiker, S. en Weissinger, A.K.** (2001). The role of cell differentiation state and HMG-I/Y in the expression of transgenes flanked by matrix attachment regions. *Transgenic Res*, 10: 465–470, 2001.

Bertier, L. (2008). Testen van een plaats specifiek recombinatiesysteem in transgene banaanculturen voor de verwijdering van het selectiemerker gen. Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen. Thesis, 109p.

Beyene, G., Buenrostro-Nava, M.T., M.D., Damaj, Gao, S.-J., Molina, J., Mirkov, J.T. (2011). Unprecedented enhancement of transient gene expression from minimal cassettes using a double terminator. *Plant Cell Rep*, 30: 13–25.

Bi, C.-P. en Benham, C.J. (2004). WebSIDD: Server for prediction of the Stress-Induced Duplex Destabilized sites in superhelical DNA. *Bioinformatics*, 20: 1477-1479.

Birch, R.G. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 48: 297–326.

Bode, J., Benham, C., Knopp, A. en Mielke, C. (2000). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 10(1): 73-90.

Bode, J., Winkelmann, S., Götz, S., Spiker, S., Tsutsui, K., Chengpeng, B., Prashanth A.K. en Benham, C. (2006). Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J Mol Biol*, 358: 597-613.

Bock, R. (2007). Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotech*, 18: 100–106.

Brouwer, C., Bruce, W., Maddock, S., Avramova, Z. en Bowen, B. (2002). Suppression of transgene silencing by matrix attachment regions in maize: a dual role for the maize 5' ADH1 matrix attachment region. *Plant Cell*, 14: 2251–2264.

Butaye, K. (2004). Analysis of transgene expression variation in *Arabidopsis thaliana*. Dissertationes de Agricultura. Doctoraatsproefschrift 628. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 140 p.

Butaye, K.J.M., Goderis, I.J.W.M., Wouters, P.F.J., Poes, J.M.T.G., Delauré, S.L., Broekaert, W.F., Depicker, A., Cammue, B.P.A. en De Bolle, M.F.C. (2004). Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J.* 39: 440–449.

Butaye, K.M.J., Cammue, B.P.A., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C. (2005). Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breeding*, 16: 79–81.

Cai, C.Q., Doyon, Y., Ainley, W.M., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Rock, J.M., Lee, Y.-L., Garrison, R., Schulenberg, L., Blue, R., Worden, A., Baker, L., Faraji, F., Zhang, L., Holmes, M.C., Rebar, E.J., Collingwood, T.N., Rubin-Wilson, B., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Petolino, J.F. (2009). Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol* (2009) 69: 699–709.

Cervera, M. (2004). Transgenic Plants: Methods and Protocols. Histochemical and Fluorometric Assays for *uidA* (GUS) Gene Detection. *Methods in Molecular Biology*, 286: 203-213.

Cheng, Z., Targolli, J. en Wu, R. (2001). Tobacco matrix attachment region sequence increased transgene expression levels in rice plants. *Mol Breeding*, 7: 317–327.

Clarke, J.L., Daniell, H., Nugent, J.M. (2011). Chloroplast biotechnology, genomics and evolution: current status, challenges and future directions. *Plant Mol Biol* (2011) 76: 207–209.

Curaba, J. en Chen, X. (2008). Biochemical Activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA Polymerase 6. *J Biol Chem*, 283(6): 3059–3066.

Czech, B. en Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 12: 19-31.

De Bolle, M.F.C., Butaye, K.M.J., Coucke, W.J.W., Goderis, I., Wouters, P.F.J., van Boxel, N., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A. (2003). Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 165: 169 – 179.

De Bolle, M.F., Butaye, K.M.J., Goderis, I., Wouters, P.F.J., Jacobs, A., Delauré, S.L., Depicker A., Cammue, B.P.A (2007). The influence of matrix attachment regions on transgene expression in *Arabidopsis thaliana* wild type and gene silencing mutants. *Plant Mol Biol*, 63: 533–543.

Desai, P.N., Shrivastava, N., Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28: 427–435.

De Wilde, C., Podevin, N., Windels, P., Depicker, A. (2001). Silencing of antibody genes in plants with single-copy transgene inserts as a result of gene dosage effects. *Mol Genet Genomics*, 265: 647–653.

Di Serio, F., Martínez de Alba, A.E., Navarro, B., Gisel, A. en Flores, R. (2010). RNA-Dependent RNA Polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J Virol*, 84 (5): 2477–2489.

Dowson, D.M.J., Ashurst, J.L., Mathias, S.F., Watts, J.W., Wilson, T.M., Dixon, R.A. (1993). Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco. *Plant Mol Biol*. 23(1): 97–109.

Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. (2010). Geneious v5.1, Beschikbaar op <http://www.geneious.com>.

Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol*, 147: 456–468.

Dugdale, B., Becker, D.K., Beetham, P.R., Harding, R.M., en Dale, J.L. (2000). Promoters derived from banana bunchy top virus DNA-1 to -5 direct vascular-associated expression in transgenic banana (*Musa spp.*). *Plant Cell Reports*, 19: 810-814.

Fukushige, S. en Sauer, B. (1992). Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 7905-7909.

Gheysen, G., Villarroel, R. en Van Montau, M. (1991). Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev*, 5: 287-297.

Grant-Downton, R.T., Dickinson, H.G. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Ann Rev Bot*, 96: 1143–1164.

Halweg, C., Thompson, W.F., Spiker, S. (2005). The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study. *Plant Cell*, 17 : 418 – 429.

Han, K.H., Ma, C.P. en Strauss, S.H. (1997). Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar. *Transgenic Res.* 6: 415 – 420.

Harraghy, N., Gaussin, A., Mermod, N. (2008). Sustained transgen expression using MAR elements. *Current Gene Therapy*, 8: 353-366.

Henry, H.Q., Goetze, S., Ye, C.J., Liu, G., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Wykes, S.M., Bode, J. en Krawetz, S.A. (2004). Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *Journal of Cell Science*, 117: 999-1008.

Hermann, S.R., Harding, R.M. en Dale, J.L. (2001). The banana actin 1 promoter drives near-constitutive transgene expression in vegetative tissues of banana (*Musa spp.*). *Plant Cell Rep*, 20: 525–530.

Hill, T. en Lewicki, P. (2007). STATISTICS Methods and Applications. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. StatSoft, Tulsa, OK. Beschikbaar op: www.statsoft.com.

Hobbs, S.L.A., Warketin, T.D. en DeLong, C.M.O. (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol*, 21 (1): 17-26.

Hollick, J.B. (2008) Sensing the epigenome. *Trends Plant Sci*, 13: 398–404.

Holmes-Davis, R. en Comai, L. (2002). The matrix attachment regions (MARs) associated with the heat shock cognate 80 gene (*HSC80*) of tomato represent specific regulatory elements. *Mol Gen Gen*, 266 : 891 – 898.

- Hood, E.E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. en Clinton, M. D.** (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol*, 168: 1291-1301.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, S. en Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). *Transgenic Res*, 2: 208-218.
- Huang, L.F., Liu, Y.K., Lu, C.A., Hsieh, S.L. en Yu, S.M.** (2005). Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture. *Transgenic Res*, 14: 569–581.
- Huang, X., Huang, X.L., Xiao, W., Zhao, J.T., Dai, X.M., Chen, Y.F., en Li, X.J.** (2007). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via a liquid co-cultivation system. *Plant Cell Reports*, 26: 1755-1762.
- James, C.** (2009). Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief 41: Executive Summary.
- Jin, Z., Shu-Jun, L., Si-Song, M., Wei, Y., Yuan-Lei, H., Qiang, W., Zhong-Ping, L** (2004). Effect of Matrix Attachment Regions on resveratrol production in tobacco with transgene of stilbene synthase from *Parthenocissus henryana*. *Acta Bot Sin*, 46 : 948 – 954.
- Kawabe, A. en Miyashita, N.T.** (2003). Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. *Genet Syst*, 78: 343-352.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. en McPherson, J.** (1987). Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science* 236: 1299-1302.
- Kim, W.S., Kim, J., Krishnan, H.B., Nahm, B.H.** (2005). Expression of *Escherichia coli* branching enzyme in caryopses of transgenic rice results in amylopectin with an increased degree of branching. *Planta*, 220: 689 – 695.
- Kole, C., Michler, C. en Abbott, A.G.** (2010). Transgenic crop plants: principles and development. Springer, Berlin Heidelberg. 315p.

- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. en Watanabe, Y.** (2009). SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters*, 583: 1261–1266.
- Kumar, S., Franco, M., Allen, G.C.** (2006a). Gene targeting: development of novel systems for genome engineering in plants. In: Teixeira da Silva, J.A. (eds.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. Global Science Books, London, p 84 – 98.
- Kumar, S., Allen, G.C., en Thompson, W.F.** (2006). Gene targeting in plants: fingers on the move. *Trends Plant Sci*, 11: 159-161.
- Leegood, R.C.** (2007). A welcome diversion from photorespiration. *Nat Biotech*, 25: 539 – 540.
- Levin, J.S., Thompson, W.F., Csinos, A.S., Stephenson, M.G., Weissinger, A.K.** (2005). Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco. *Transgenic Res*, 14: 193–206.
- Li, J., Brunner, A.M., Meilan, R., en Strauss, S.H.** (2008). Matrix attachment region elements have small and variable effects on transgene expression and stability in field-grown *Populus*. *Plant Biotechnol J*, 6: 887–896.
- Liu, J.W. en Tabe, L.M.** (1998). The influences of two plant nuclear matrix attachment regions (MARs) on gene expression in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*, 39: 115–123.
- Loc, N.H., Thinh, L.T., Yang, M.-S. en Kim, T.-G.** (2011). Highly expressed cholera toxin B subunit in the fruit of a transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16 (3): 576-580.
- Lyznik, L.A., Gordon-Kamm, W.J. en Tao, Y.** (2003). Site-specific recombination for genetic engineering in plants. *Plant Cell Rep*, 21: 925–932.
- Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W.** (1991). The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. *Plant Mol Biol*, 16:199–207.

- Mallory, A.C., Parks, G., Endres, M.W., Baulcombe, D., Bowman, L.H., Pruss, G.J. en Vance, V.B.** (2002). The ampliconplus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat Biotechnol*, 20: 622–625.
- Mankin, S.L., Allen, G.C., Phelan, T., Spiker, S. en Thompson, W.F.** (2003). Elevation of transgene expression level by flanking matrix attachment regions (MAR) is promoter dependent: a study of the interactions of six promoters with the RB7 3' MAR. *Transgenic Res*, 12: 3–12.
- Matzke, A.J. en Matzke, M.A.** (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 142–148.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis K., Redei G.P., Schell J., Hohn B. en Koncz C.** (1991). T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO Journal*, 10 (3): 697-704.
- Maximova, S., Miller, C., Antunez de Mayolo, G., Pishak, S., Young, A. en Gultinan, M.J.** (2003). Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of Matrix Attachment Regions on GFP expression. *Plant Cell Rep*, 21: 872 – 883.
- Michalowski** (1999). Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. *Biochemistry*, 38: 12795-12804.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. en Ohashi, Y.** (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol*, 37: 49–59.
- Mlynarova, L., Loonen, A., Heldens, J., Jansen, R.C., Keizer P., Stiekema, W.J. en Nap J.P.** (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell*, 6: 417 – 426.
- Mlynarova, L., Jansen, R.C., Conner, A.J., Stiekema, W.J. en Nap J.P.** (1995). The MAR-mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants. *Plant Cell*, 7: 599–609.

- Mlynarova, L., Loonen, A., Mietkiewska, E., Jansen, R.C. en Nap, J.P.** (2002). Assembly of two transgenes in an artificial chromatin domain gives highly coordinated expression in tobacco. *Genetics*, 160: 727 – 740.
- Mlynarova, L., Hricova, A., Loonen, A. en Nap J.P.** (2003). The presence of a chromatin boundary appears to shield a transgene in tobacco from RNA silencing. *Plant Cell*, 15: 2203 – 2217.
- Müller, A.E.** (2010). Gene Silencing in Plants: transgenes as targets and effectors. In: Kempken, F. en Jung, C. (eds.). *Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry 64*. Springer, Berlin Heidelberg. p 79-101.
- NanoDrop Technologies Inc** (2007). Nanodrop: thechnical support bulletin. NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware USA. 2p.
- Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H-J., Kreuzaler, F. en Peterhansel, C.** (2007). Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. *J Exp Bot*, 58: 2709 – 2715.
- Oh, S.J. , Jeong, J.S., Kim, E.H., Yi, N.R., Yi, S.I., Jang, I.C., Kim, Y.S., Suh, S.C., Nahm, B.H. en Kim J.K.** (2005). Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep*, 24: 145 – 154.
- Ollevier, F. en Wenseleers, T.** (2000). Werkcolleges statistische gegevensverwerking. Katholieke Universiteit Leuven, Laboratorium voor Ecologie en Aquacultuur. p 1-39.
- Ow, D.W.** (2007). GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Curr Opin Biotechnol*, 18: 115–120.
- Padidam, M.** (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 169–177.
- Peach, C. en Velten, J.** (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol*, 17: 49-60.

Pelczar, C.P., Kalck, V., Gomez, D. en Hohn, B. (2004). *Agrobacterium* proteins VirD2 and VirE2 mediate precise integration of synthetic T-DNA complexes in mammalian cells. *EMBO reports*, 5 (6): 632–637.

Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. en Poethig, R.S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 18: 2368–2379.

Peréz-Hernandez, J.B., Remy, S., Swennen, R., en Sági, L. (2006). Banana (*Musa spp.*). In: *Methods in Molecular Biology*, 344: *Agrobacterium* Protocols, volume 2. K. Wang Editor. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA. 167-175.

Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. en Fischhoff, D.A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 3324–28.

Petersen, K. , Leah, R. , Knudsen, S., Cameron-Mills, V. (2002). Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequencies and reduce variance of transgene expression in barley. *Plant Mol Biol*, 49 : 45 – 58.

Pitzschke, A. en Hirt, H. (2010). *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29 (6): 1021–1032.

Pruss, G.J., Lawrence, C.B., Bass, T., Li, Q.Q., Bowman, L.H. en Vance, V. (2004). The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology*, 320: 107–120.

Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot*, 56: 1-14.

Remy, S., Buyens, A., Cammue, B.P.A., Swennen, R., en Sági, L. (1998). Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins. *Acta Horticulturae*, 490: 433-436.

Sági, L., Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., Desmet, K., Swennen, R., en Cammue, B.P.A. (1995a). Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Nat Biotechnol*, 13: 481-485.

Samadder, P., Sivamani, E., Lu, J., Li, X. en Qu, R. (2008). Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice *rubi3* gene in transgenic rice cells. *Mol Genet Genomics*, 279: 429–39.

Santos, E., Remy, S., Thiry, E., Windelinckx, S., Swennen, R. en Sági, L. (2009). Characterization and isolation of a T-DNA tagged banana promoter active during *in vitro* culture and low temperature stress. *BMC Plant Biology*, 9 (77): 1-15.

Scheid, O.M., Paszkowski, J. en Potrykus, I. (1991). Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 228: 104-112.

Schöffl, F., Schroder, G., Kliem, M. en Rieping, M. (1993). An SAR sequence containing 395 bp DNA fragment mediates enhanced, gene-dosage-correlated expression of a chimaeric heat shock gene in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res*, 2: 93–100.

Sels, J., Delauré, S.L., Aerts, A.M., Proost, P., Cammue, B.P.A. en De Bolle, M.F.C. (2007). Use of a PTGS-MAR expression system for efficient *in planta* production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Res*, 16: 531–538.

Sharma, A.K., en Sharma, M.K. (2009). Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27: 811–832.

Sidorenko, L., Bruce, W., Maddock, S., Tagliani, L., Li, X.G., Daniels, M. en Peterson, T. (2003). Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants. *Transgenic Res*, 12 : 137 – 154.

Singh, G.B., Kramer, J.A., Krawetz, S.A. (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix . *Nucleic Acids Res*, 25 : 1419 – 1425.

Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. en Waterhouse, P.M. (2000). Gene expression – total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407: 319–320.

Spiker, S. en Thompson, W.F. (1996). Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. *Plant Physiology*, 110: 15-21.

Srivastava, V. en Ow, D.G. (2004). Marker-free site-specific gene integration in plants. *Trends in Biotechnology*, 22 (12): 627 - 629.

Ülker, B., Allen, G.C., Thompson, W.F., Spiker, S., Weissinger, A.K. (1999). A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. *Plant J*, 18 : 253 – 263.

Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, W., Christou, P., Allen, G.C. en Thompson, W.F. (1999). Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant J*, 18: 233–242.

Valkov, V.T., Gargano, D., Manna, C., Formisano, G., Dix, P.J., Gray, J.C., Scotti, N. en Cardi, T. (2011). High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. *Transgenic Res*, 20: 137–151.

Vaistij, F.E. en Jones, L. (2009). Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants. *Plant Physiology*, 149: 1399–1407.

van der Geest, A.H.M., Hall, G.E., Spiker, S. en Hall, T.C. (1994). The β -phaseolin gene is flanked by matrix attachment regions. *Plant J*, 6: 413 – 423.

van der Geest, A.H.M., Welter, M.E., Woosley, A.T., Pareddy, D.R., Pavelko, S.E., Skokut, M. en Ainley, W.M. (2004). A short synthetic MAR positively affects transgene expression in rice and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 2: 13–26.

Van Leeuwen, W., Mlynarova, L., Nap, J.P., van der Plas, L.H. en van der Krol, A.R. (2001). The effect of MAR elements on variation in spatial and temporal regulation of transgene expression. *Plant Mol Biol*, 47: 543 – 554.

Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C., en Vernhettes, S. (1998a). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*, 16: 651-659.

Vaucheret, H., Elmayan, T., Thierry, D., van der Geest, A., Hall, T., Conner, A.J., Mlynarova, L. en Nap, J-P. (1998b). Flank matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homolgy-dependent *trans*-silencing in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet*, 259: 388-392.

Vaucheret, H. en Fagard, M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, 17 (1): 29-34.

Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, 20: 759-771.

Vishnevetsky, J., White, T.L., Palmateer, A.J., Flaishman, M., Cohen, Y., Elad, Y., Velcheva, M., Hanania, U., Sahar, N. en Dgani, O. (2010). Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic Res*, 20 (1): 61-72.

Voinnet, O., Rives, S., Mestre, P. en Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 33: 949–956.

Wagaba, H. (2008). Activity of native constitutive promoters in transgenic banana lines. Vrije Universiteit Brussel, Katholieke Universiteit Leuven en Universiteit Antwerpen. Thesis, 95p.

Wassenegger, M. en Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci*, 11:142–151.

Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey, Jr. R.J., Irwin, P.A., Rajagopal, J. en Lonosky, P.M. (2005). Highfrequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 44: 693–705.

Yang, D., Guo, F., Liu, B., Huang, N. en Watkins, S.C. (2003). Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta*, 216: 597–603.

Yunus, G.K.A., Parveez, I. en Ho, C. (2008). Transgenic plants producing polyhydroxyalkanoates. *Asia Pacific J Mol Biol Biotechnol*, 16: 1–10.

Xue, H., Yang, Y.-T., Wu, C.-A., Yang, G.-D., Zhang, M.-M. en Zheng, C.-C. (2005). TM2, a novel strong matrix attachment region isolated from tobacco, increases transgene expression in transgenic rice calli and plants. *Theor Appl Genet*, 110: 620–627.

Zeyenko, V., Ryabovaa, L.A., Gallieb, D.R. en Spirin, A.S. (1994). Enhancing effect of the 3'-untranslated region of tobacco mosaic virus RNA on protein synthesis in vitro. *FEBS Letters*, 354: 271-273.

Zhang, M.-M., Jia, L.-S., Xuea, H., Yanga, Y.-T., Wua, C.-A. en Zheng, C.-C. (2007). High transformation frequency of tobacco and rice via *Agrobacterium*-mediated gene transfer by flanking a tobacco matrix attachment region. *Physiologia Plantarum*, 129: 644–651.

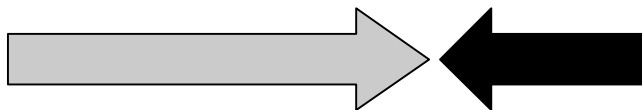
Bijlage I

Sequentie van het 3'-uiteinde van het cDNA van het *rdr6* uit *O. sativa*:

```
AAAAGATTC TTGGAAGGCTTTATCGTTCAATCCAAGAGGCCTCCAATGGTGATGTGG  
TGTCACAAGAGGTTTGCACCTCCAATGATCTGCCTTATGACATAGATCTGGAAGTTC  
CTGGTGCATCAGATTTCTCGCGAGTGCTTGGCAATGCAAGTGTTCATAACGACGCGC  
AGCTGAGTGCGCTGCTCAGTCAGTACAGGGTCCGCACTGAAGCTGAACTTGTGACAG  
GGCACATAACGTTCCCTTGTTAAGAACAGCAGCAAGAAGCAAGGCGACATAAAGGACA  
GGCTGAAGACTGCTTACTCTGCACTACGCAAGGAGTTCAAAGTACCTTTGAGAGCA  
TAGCATCGGATCAATGCGAGATTGGTGATGACGAGAAGAATCTGCTGTACGAGATGA  
AGGCCCTCTGCCTGGTACCAGGTGACCTATCACCCCAAATGGGTGGAGAAGTCGAGGG  
GCATTCTGGGCCAGATGGTGAGGAAATACCGGCAAGCCTTAGCTTTGCATGGATCC  
CGGTGGATTACTTGGCGCGGATAAAGCTAAGGTGCCATGGTAAAGTGAGAGTTGAAG  
GCCAAAAGCCTGTTGAAAGGCTTG
```

Primersequenties (zonder knipplaatsen voor restrictie-enzymen) van het kort en lang fragment zijn onderlijnd. Het lang fragment is grijs gemarkeerd. Het kort fragment is vet gedrukt.

1) Ligging van het lang fragment (grijs) en het kort fragment (zwart) in het 'hairpin'-construct.



2) Vorming van een *rdr6*-'hairpin' na transcriptie, omwille van de aanwezigheid van complementaire delen in het korte en lange fragment.



