

„Dynamik von Chromatinmodifikationen und ihr Einfluss auf regulatorische Faktoren der Blattseneszenz in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



vorgelegt von

Frau Nicole Ay

geb. am 29.03.1979 in Halle (Saale)

Gutachter 1: Prof. Dr. Klaus Humbeck

Gutachter 2: Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

Gutachter 3: Prof. Dr. Bernd Müller-Roeber

Halle (Saale), Oktober 2014

Tag der öffentlichen Promotionsverteidigung: 01.07.2015

- Für meine Familie -

- INHALTSVERZEICHNIS -

PUBLIKATIONSLISTE	I
DANKSAGUNG	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
I. EINLEITUNG	5
I.1 Alterungs- und Zelltodprozesse	5
I.2 Seneszenz der Pflanzen	5
I.3 Die Blattseneszenz	6
I.3.1 Induktion und Regulation der Blattseneszenz	9
I.3.1.1 Molekulargenetische Regulation der Blattseneszenz	10
I.3.1.1.1 Genexpression während der Blattseneszenz	10
I.4 Verschiedene Ebenen der Regulation der Genexpression	11
I.4.1 Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren	13
I.4.1.1 Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren während der Seneszenz	13
I.4.2 Regulation der Genexpression durch dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur	15
I.4.2.1 DNA-Methylierung und Demethylierung	16
I.4.2.2 Histonmodifikationen	19
I.4.2.2.1 Lysinmethylierung und Demethylierung von Histonen in Pflanzen	21
I.5 Kontrolle der Seneszenz durch Veränderungen der Chromatinstruktur - eine Arbeitshypothese	23
II. ZIELSETZUNG	26
III. ERGEBNISSE	27
III.1 Etablierung eines definierten Seneszenzscreeningsystems	27
III.1.1 Physiologische Charakterisierung von definierten Seneszenzstadien	27
III.1.2 Molekulare Charakterisierung der definierten Seneszenzstadien	29
III.2 Globale Analysen der Chromatinstruktur von Arabidopsis Interphasekernen in ausgewählten Entwicklungsstadien	31
III.2.1 Veränderungen der Verteilungsmuster euchromatischer Histonmodifizierungen von Interphasekernen während der Seneszenz	32
III.2.2 Veränderungen der Verteilungsmuster repressiver Histonmodifizierungen von Interphasekernen während der Seneszenz	32
III.2.3 Dekondensation der Chromozentren während der Seneszenz	34
III.2.4 Veränderungen der Nukleoli während der Seneszenz	35

III.3 Untersuchungen des lokalen Chromatinstatus ausgewählter SAGs während der Seneszenz	35
III.3.1 Etablierung der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) für das Arabidopsis-Seneszenzsystem	36
III.3.2 Histonmodifikationsmuster an SAGs während der Seneszenz	38
III.3.2.1 Histonmodifikationsmuster an <i>SAG12</i> während der Seneszenz.....	38
III.3.2.2 Histonmodifikationsmuster an <i>ANAC083</i> während der Seneszenz	40
III.3.2.3 Histonmodifikationsmuster an <i>WRKY53</i> während der Seneszenz	42
III.4 Übersicht chromatinassoziierter Schlüsselfaktoren und ihr möglicher Einfluss auf Seneszenzprozesse	44
III.4.1 Die putative Histonmethyltransferase SUVH2 und ihr Expressionsverhalten während der Entwicklung.....	45
III.4.2 Charakterisierung transgener <i>SUVH2-loss-of-function</i> und <i>gain-of-function</i> -Pflanzen.....	47
III.4.2.1 Allgemeine Phänotypisierung von transgenen <i>SUVH2-loss-of-function</i> - und <i>gain-of-function</i> -Pflanzen	47
III.4.2.2 Untersuchungen des Seneszenzverlaufs der transgenen Pflanzen.....	50
III.4.2.2.1 Phänotypisierung des Seneszenzverlaufs von <i>svvh2</i> -GK-Pflanzen	50
III.4.2.2.2 Phänotypisierung des Seneszenzverlaufs von SUVH2 überexprimierenden Pflanzen ...	52
III.4.3 Expressionsverhalten von Seneszenzmarkergenen in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen	54
III.4.3.1 Expressionsverhalten von SAG-Markergenen in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	54
III.4.3.2 Expressionsverhalten von SDG-Markergenen in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	56
III.4.4 Untersuchungen des Chromatins in Interphasekernen SUVH2 überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz	57
III.4.4.1 Globale Chromatinveränderungen während der Seneszenz in Interphasekernen der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	57
III.4.4.1.1 Verteilungsmuster euchromatischer Histonmodifizierungen in Interphasekernen SUVH2 überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz	57
III.4.4.1.2 Verteilungsmuster repressiver Histonmodifizierungen in Interphasekernen SUVH2 überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz	59
III.4.4.1.3 Analyse der Chromozentren in Interphasekernen SUVH2 überexprimierender Pflanzen im Verlaufe der Seneszenz.....	60
III.4.4.1.4 Nukleoli von Interphasekernen SUVH2 überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz	60
III.4.4.2 Lokale Chromatinveränderungen an ausgewählten SAGs während der Seneszenz in der <i>SUVH2</i> -Überexpressionslinie.	61
III.4.4.2.1 Histonmodifikationsmuster an SAGs während der Seneszenz in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie..	62

III.4.4.2.1.1 Histonmodifikationsmuster an <i>SAG12</i> in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	62
III.4.4.2.1.2 Histonmodifikationsmuster an <i>ANAC083</i> in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	65
III.4.4.2.1.3 Histonmodifikationsmuster an <i>WRKY53</i> in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	68
III.4.4.2.2 DNA-Methylierungsmuster an <i>WRKY53</i> in WT und <i>SUVH2</i> überexprimierenden Pflanzen.....	70
III.5 Identifizierung neuer regulatorischer Komponenten der Blattseneszenz als mögliche Ziele von Chromatinveränderungen während der Seneszenz.....	73
III.5.1 <i>Expressionsprofiling</i> von Transkriptionsregulatoren in WT- und <i>SUVH2</i> -Überexpressionspflanzen während der Seneszenz.....	74
III.5.2 Identifizierung von seneszenzabhängig exprimierten regulatorischen Faktoren im WT.....	75
III.5.3 Vergleich der Expressionsmuster regulatorischer Faktoren zwischen dem WT und der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	76
III.5.4 Untersuchungen zum Einfluss der <i>SUVH2</i> -Überexpression auf die Regulation von Genfamilien.....	77
III.5.5 Clusteranalysen der seneszenzassoziierten regulatorischen Faktoren im WT und in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	79
III.5.6 Detaillierte Expressionsanalysen ausgewählter Kandidatengene der Cluster 2, 3 und 5.....	82
III.5.6.1 Detaillierte Expressionsanalysen von Kandidatengenen aus Cluster 2.....	82
III.5.6.2 Detaillierte Expressionsanalysen von Kandidatengenen aus Cluster 3 und 5.....	85
III.5.7 <i>HY5</i> als möglicher <i>upstream</i> Regulator von SARFs in der Seneszenz.....	86
III.5.8 EAR-Motiv kodierende SARFs in der Seneszenz.....	88
III.5.9 Analyse der Verteilungsmuster von <i>HY5</i> -Zielgenen sowie EAR-Motiv kodierenden Genen unter den seneszenzabhängig regulierten Faktoren sowie der Einfluss der <i>SUVH2</i> -Überexpression.....	89
III.6 Der Einfluss der <i>SUVH2</i> -Überexpression auf die Expression der <i>SUVH</i> -Gene während der Seneszenz.....	92
IV. DISKUSSION & AUSBLICK.....	95
IV.1 Während der Blattseneszenz kommt es zu globalen Veränderungen der Chromatinstruktur in Arabidopsis Interphasezellkernen.....	95
IV.2 Die Überexpression von <i>SUVH2</i> führt zu einem verzögerten Verlauf der Blattseneszenz und supprimiert globale seneszenzabhängige Chromatinveränderungen.....	99
IV.3 Lokale Histonmodifikationsmuster an SAG-Markergenen während der Blattseneszenz in Arabidopsis.....	101

IV.4 Die Überexpression von SUVH2 resultiert in Änderungen der seneszenzspezifischen Histonmodifikationsmuster an SAG-Markergenen.....	107
IV.5 Identifizierung regulatorischer Faktoren der Seneszenz als mögliche Ziele lokaler Chromatinveränderungen durch die <i>SUVH2</i> -Überexpressionslinie.....	111
IV.5.1 Untersuchungen zum Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Regulation von Genfamilien.....	112
IV.5.2 Die Überexpression von SUVH2 hat unterschiedliche Auswirkungen auf das Expressionsverhalten von SARFs.....	113
IV.5.3 HY5: ein putativer <i>upstream</i> Regulator der Seneszenz und seine Zielgene werden stark durch die Überexpression von SUVH2 beeinflusst.....	117
IV.5.4 EAR-Motiv enthaltene TFs bilden eine große Gruppe der SARFs und werden insbesondere durch die Überexpression von SUVH2 beeinflusst.....	118
IV.6 Die Expression <i>SUVH2</i> homologer Gene während der Seneszenz und der Einfluss der SUVH2-Überexpression.....	119
V. MATERIAL & METHODEN	122
V.1 Verwendete Materialien.....	122
V.1.1 Chemikalien.....	122
V.1.2 Enzyme und molekularbiologische “Kits“.....	122
V.1.3 Größenstandards.....	122
V.1.4 Oligonukleotide.....	122
V.1.5 Vektoren.....	122
V.1.6 Bakterienstämme.....	122
V.1.7 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	123
V.1.8 Kulturmedien für die Anzucht von Arabidopsis.....	123
V.1.9 Pflanzenmaterial und Saatgut.....	123
V.2 Methoden.....	123
V.2.1 Anzuchtmethoden.....	123
V.2.2 Ernte des Pflanzenmaterials.....	124
V.2.3 Physiologische Methoden.....	124
V.2.3.1 Messung des Chlorophyllgehaltes.....	124
V.2.3.2 Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz als Maß der PSII-Effizienz.....	125
V.2.4 Definition der Entwicklungsstadien über physiologische Parameter.....	125
V.2.5 Molekularbiologische Methoden.....	125
V.2.5.1 Generelle molekularbiologische Methoden.....	125
V.2.5.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten über die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	125
V.2.5.2.1 Kolonie-PCR.....	125
V.2.5.2.2 T-DNA Insertionstest mittels PCR.....	126

V.2.5.2.3 Gradienten-PCR für die Bestimmung der optimalen <i>Annealing</i> -Temperatur	126
V.2.5.2.4 Sondenmarkierungs-PCR	127
V.2.5.2.5 Bisulfit-Reamplifikations-PCR	128
V.2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation in <i>E. coli</i>	128
V.2.5.4 Herstellung von RbCl ₂ -kompetenten Zellen	129
V.2.5.5 DNA-Sequenzierung	129
V.2.5.6 Isolation von Nukleinsäuren.....	129
V.2.5.6.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	129
V.2.5.6.2 Isolation genomischer DNA aus Arabidopsis	129
V.2.5.6.2.1 gDNA-Extraktion für die Überprüfung der T-DNA-Insertion.....	129
V.2.5.6.2.2 gDNA-Extraktion für DNA-Methylierungsexperimente über Bisulfitsequenzierung	130
V.2.5.6.3 Isolation von pflanzlicher RNA für die <i>Northern</i> -Blot, qRT-PCR und Transkriptionsfaktorplattformanalysen	130
V.2.5.6.3.1 Isolierung von poly(A)+-RNA	130
V.2.5.7 Expressionsstudien	130
V.2.5.7.1 Genexpressionsanalysen mittels <i>Northern</i> Technik	130
V.2.5.7.2 Analyse der Transkriptgehalte mittels quantitativer <i>realtime</i> -RT-PCR (qRT-PCR)	131
V.2.5.7.3 Genexpressionsstudien der Transkriptionsfaktorplattform mittels qRT-PCR	132
V.2.5.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	133
V.2.5.8.1 RNA-Konzentrationsbestimmung	133
V.2.5.8.2 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	133
V.2.5.9 DNA-Agarosegelelektrophorese	133
V.2.5.10 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen	133
V.2.5.11 Immunozytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern.....	133
V.2.5.11.1 Nachweis von Histonmodifikationen	133
V.2.5.11.2 Immunozytologischer Nachweis des SUVH2-Proteins.....	134
V.2.5.11.3 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungs-Analysen (FiSH).....	134
V.2.5.12 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden für FiSH	134
V.2.5.13 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP).....	135
V.2.5.14 Bisulfitsequenzanalyse	135
V.2.6 Datenbankenanalysen und Bioinformatik	136
V.2.6.1 Datenbankanalysen.....	136
V.2.6.2 Clusteranalysen der Transkriptionsfaktorplattformdaten	137
V.2.6.3 Statistische Methoden.....	137
V.2.6.3.1 Statistische Analyse der physiologischen Messungen, Expressions- und ChIP-Analysen	137
V.2.6.3.2 Statistische Analyse der Transkriptionsfaktorplattformdaten	137

V.2.6.3.3 Überrepräsentationsanalyse	137
V.2.7 Primerdesign.....	137
LITERATURVERZEICHNIS	139
APPENDIX	X
A.1 Histonmodifikationsmuster an ausgesuchten Referenzsequenzen für die Normalisierung der ChIP-Daten in reifen und seneszenten Blättern von Arabidopsis WT-Pflanzen.....	X
A.2 Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern im WT	XIII
A.3 Histonmodifikationsmuster an Markergenen für die Normalisierung der ChIP-Daten während der Seneszenz für die <i>SUVH2</i> -oe-Linie	XIII
A.4 Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	XIV
A.5 H3K27me3-ChIP-seq Ergebnisse für die <i>SAG12</i> -Genregion (Brusslan et al. 2012)	XV
A.6 DNA-Methylierungsprofile an Kontrollsequenzen der Bisulfitsequenzierungsanalysen	XVI
A.7 Auflistung aller im WT und/oder in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie als differentiell reguliert definierten Gene der Expressionsprofiling-Untersuchungen der qRT-PCR-Plattformdaten	XVII
A.8 Primersequenzen	XX
CURRICULUM VITAE	XXIV
EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG	XXV

- PUBLIKATIONSLISTE -

Die praktischen Arbeiten für die Dissertation fanden im Zeitraum von März 2005 bis November 2009 statt. Teile dieser Arbeit sind in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

1. Ay N, Irmeler K, Fischer A, Uhlemann R, Reuter G, Humbeck K (2009): Epigenetic programming via histone methylation at *WRKY53* controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 58, S. 333–346.
2. Ay N, Raum U, Balazadeh S, Seidenticker T, Fischer A, Reuter G, Humbeck K (2014): Regulatory factors of leaf senescence are affected in *Arabidopsis* plants overexpressing the histone methyltransferase SUVH2. In: *J Plant Growth Regul* 33, S. 119–136.

Weitere Veröffentlichungen:

3. Ay N, Clauß K, Barth O, Humbeck K (2008): Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves. In: *Plant Biology* 10, S. 121–135.
4. Ay N, Janack B, Humbeck K (2014): Epigenetic control of plant senescence and linked processes. In: *J Exp Bot* 65(14), S. 3875-3887.
5. Janack¹ B, Ay¹ N, Humbeck K (2014): Studies on epigenetics of plant senescence. (Submitted) ¹authors contributed equally to the work
6. Ay¹ N, Janack¹ B, Fischer A, Reuter G, Humbeck K (2014): Senescence-specific histone modifications and DNA methylation at the senescence-associated gene *HvS40* in barley. (In preparation); ¹authors contributed equally to the work

- DANKSAGUNG -

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Klaus Humbeck für die Überlassung dieser spannenden und ausfüllenden Thematik, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung in kritischen Projektphasen sowie seine klare und motivierende Betrachtung der Dinge bedanken.

Meinen Zweit- & Drittgutachtern Prof. Dr. Nicolas von Wirén und Prof. Dr. Bernd Müller-Roeber danke ich für die Übernahme der Gutachten und die sich daraus ergebenden wissenschaftlichen Anregungen. Zudem möchte ich Prof. Dr. Müller-Roeber dafür danken, dass ich die TF-Plattformanalysen am MPI in Golm durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. Reuter möchte ich sehr für seine Unterstützung beim Einstieg in die „(Un)Tiefen“ der Chromatinwelt, seine bestechende Sicht auf die Dinge und die vielen guten Vorschläge während unserer Zusammenarbeit danken. Ein großes Dankeschön auch dafür, dass ich stets die technischen und theoretischen Ressourcen seiner Arbeitsgruppe nutzen durfte.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Fischer, der mir über die ganzen Jahre ein wertvoller Diskussionspartner und Kollege war, von dem ich so viel Methodenkenntnis erlangen durfte und der stets ohne Einschränkungen sein Wissen mit seiner Umgebung und so auch mit mir teilte. Ganz besonders möchte ich unsere Teamarbeit bei den mikroskopischen Versuchen innerhalb meiner Arbeit am Dissertationsthema sowie meiner gesamten Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin hervorheben! Auch seine Unterstützung zusammen mit Frau Sandra Konrath bei den DNA-Methylierungsexperimenten in Arabidopsis möchte ich dankend benennen.

Frau Dipl. Biol. Kristina Irmeler möchte ich für die Einweisung in die ChIP-Technik sowie unsere gemeinsame „McChIP“-Zeit danken. Auch das war eine produktive, angenehme und sehr wertvolle Zusammenarbeit!

Frau Dr. Salma Balazadeh danke ich für Ihre Einführung in die TF-Plattformanalysen. Ihre sympathische, offene und hilfsbereite Art hat mir den Einstieg in die Arbeiten am MPI in Golm sehr erleichtert.

Auch meiner Arbeitsgruppe gilt ein großer Dank für das außergewöhnlich angenehme Arbeitsklima. Ganz besonders möchte ich mich bei Wiebke, Olaf, Stefan, Ulrike, Anne, Tina und Kathleen für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, hilfreichen Anregungen aber vor allem

auch für die mentale Unterstützung und die vielen guten Gespräche, die das Leben noch schöner machen, bedanken!

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dipl. Ing. Michael Röser, der mich in den Wirren der statistischen Analysen der TF-Plattformdaten unheimlich unterstützt hat und der mir gefühlte 1000mal bei PC-Problemen helfen konnte. Danke und Respekt McGyver!

Frau Dipl. Biol. Ulrike Raum möchte ich für ihre Unterstützung bei den Expressionsanalysen der Kandidatengene der Expressionsprofilingsanalysen danken.

Ein zusätzliches Dankeschön geht an Dr. Olaf Barth und Dr. Andreas Fischer für das kritische Lesen dieser Arbeit und die Zeit, die sie dafür aufgewendet haben.

Dipl. Ing. Katrin Kittlaus sowie Carola Kretschmer danke ich für die Durchführung der unheimlich vielen Sequenzierreaktionen.

Bei meinen Diplomanden Anne Kalweit, Verena Recke, Tina Seidensticker und Bianka Janack möchte ich mich für die vielen Erfahrungen, die ich in ihrer Betreuungszeit machen durfte, bedanken. Diese Herausforderungen haben meinen eigenen wissenschaftlichen und persönlichen Reifungsprozess mit beeinflusst. Tina möchte ich besonders für die Unterstützung bei der physiologischen Charakterisierung der *svh2*-GK-Linie bedanken, die in diese Arbeit eingeflossen ist.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Schwiegereltern und meinen Freunden! Ihr habt mich stets ausnahmslos unterstützt. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für euren Glauben an mich und das ich schon als kleines Mädchen lernen durfte, dass ich alles im Leben werden kann, was immer es auch sei.

Der größte Dank gilt jedoch meinem Mann, meinem Sohn und meinem noch ungeborenem Kind. Ihr gebt mir Sinn und vor allem Kraft für die Arbeit. Ohne euch wäre ich nicht der Mensch, der ich sein will. Toby, ohne dich hätte ich all das nicht durchgehalten, ich liebe Dich und unsere Kinder.

„Wir verlangen, das Leben müsse einen Sinn haben - aber es hat nur ganz genau so viel Sinn, als wir selber ihm zu geben imstande sind.“

Hermann Hesse

- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -

Der Buchstabencode verwendeter Protein- und Gen-Bezeichnungen wird jeweils im Text, soweit möglich, bei der ersten Nennung erklärt. Englische Termini und Anglizismen wurden als solche beibehalten und kursiv markiert.

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AGI-Code	von 'Arabidopsis Genome Initiative' vergebene Identifikationsnummer
AP2/EREBP	APETALA2/ <i>ethylene-responsive element binding protein</i> ; Familie von Transkriptionsfaktoren
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX/IAA	<i>auxin/indole-3-acetic acid</i> ; Familie von Transkriptionsfaktoren
bp	Anzahl der DNA-Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, ungefähr
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> - durch RT-PCR aus RNA erzeugte 'copy DNA'
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
ChIP	<i>Chromatin immuno precipitation</i> / Chromatinimmunopräzipitation
Col	Columbia
CT	<i>crossing threshold / cycles to threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E	Einstein
EAR	<i>ERF-associated amphiphilic repression motif</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
ERF	<i>Ethylene-responsive element-binding factor</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i> , cDNA-Fragment
et al.	lat. 'und andere'
F ₀	Grundfluoreszenz
FC	<i>Fold Change</i> , Vielfaches
FiSH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Fm	maximale Fluoreszenz
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDA	Histondeacetylase
HDM	Histondemethylase
HMT	Histonmethyltransferase
HR	hypersensitive Reaktion
ID	Identifikationsnummer
i.d.R.	in der Regel
IP	Immunopräzipitation
<i>in vitro</i>	lat. 'im Reagenzglas'
<i>in vivo</i>	lat. 'im Lebendigen'
LB	<i>left border</i> , linke Begrenzungssequenz

LHC	<i>Light harvesting complex</i>
<i>log</i>	Logarithmus
M	Molar
µg	Mikrogramm
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Gentranskript
MW	<i>molecular weight</i> ; Molekulargewicht
MYB	Familie von Transkriptionsfaktoren
NAC	(NAM, ATAF und CUC) Familie von Transkriptionsfaktoren
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
oe	<i>overexpression</i> , Überexpression
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAM	Pulsamplitudenmodulation
PCD	<i>programmed cell death</i> , programmierter Zelltod
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PSII	Photosystem II
<i>p</i> -Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
qPCR	quantitative <i>realtime</i> PCR
qRT-PCR	quantitative <i>realtime</i> RT-PCR
RB	<i>right border</i> , rechte Begrenzungssequenz
RF	regulatorischer Faktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SARF	seneszenzassoziierter regulatorischer Faktor
SDRF	<i>senescence downregulated regulatory factor</i>
sec	<i>second</i> , Sekunde
SURF	<i>senescence upregulated regulatory factor</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SRA	<i>SET and RING associated domain</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-DNA	transferierte DNA aus Ti-Plasmiden von Agrobakterien
TF(s)	Transkriptionsfaktor(en)
TKS	Transkriptionsstart
TLS	Translationsstart
TNA	Tage nach Aussaat
u. a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht translatierte Region
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

- ABBILDUNGSVERZEICHNIS -

Abbildung I-1:	Phasenmodell der Blattseneszenz und der Abhängigkeit von endo- sowie exogenen Einflussgrößen.....	8
Abbildung I-2	Schematische Darstellung der Initiation und Regulation der Blattseneszenz.....	11
Abbildung I-3:	Die verschiedenen Ebenen der Regulation der Expression eukaryotischer Gene.....	12
Abbildung I-4:	Cytosinmethylierungsreaktion.....	17
Abbildung I-5:	Posttranslationale Histonmodifikationen an den NH ₂ -Termini von Histonen, exemplarisch für H3 und H4.....	21
Abbildung I-6:	Phylogenetischer Baum der <i>SUVH</i> -Gene in Arabidopsis.....	23
Abbildung I-7:	Hypothese: Chromatinveränderungen sind an der komplexen Kontrolle der Genregulation von SAGs und SDGs beteiligt.....	24
Abbildung III-1:	Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung von Entwicklungsstadien.....	28
Abbildung III-2:	Expression von Seneszenzmarkergenen im definierten Seneszenzsystem.....	30
Abbildung III-3:	Veränderungen der Chromatinorganisation während der Blattseneszenz.....	33
Abbildung III-4:	Histonmodifikationsmuster an <i>SAG12</i> in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern.....	39
Abbildung III-5:	Histonmodifikationsmuster an <i>ANAC083</i> in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern.....	41
Abbildung III-6:	Histonmodifikationsmuster an <i>WRKY53</i> in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern.....	43
Abbildung III-7:	Struktur des <i>SUVH2</i> Gens und des kodierten Proteins sowie das Expressionsverhalten von <i>SUVH2</i> während der Entwicklung von Arabidopsis WT-Pflanzen.....	46
Abbildung III-8:	Charakterisierung der <i>SUVH2</i> -Überexpressionslinie (<i>SUVH2-oe</i>) sowie der T-DNA-Insertionslinie GABI-KAT_516A07 (<i>suvh2-GK</i>)...	49
Abbildung III-9:	Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung der <i>suvh2-GK</i> -Linie im Vergleich zum WT.....	51
Abbildung III-10:	Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung der <i>SUVH2-oe</i> -Linie im Vergleich zum WT.....	53
Abbildung III-11:	Analysen der <i>SUVH2</i> -Expression in <i>SUVH2-oe</i> bezogen auf den WT in der Seneszenzkinetik.....	54
Abbildung III-12:	Expression von SAG-Markergenen im definierten Seneszenzsystem für den WT und die <i>SUVH2-oe</i> -Linie.....	55
Abbildung III-13:	Expression von SDG-Markergenen im definierten Seneszenzsystem für den WT und die <i>SUVH2-oe</i> -Linie.....	56
Abbildung III-14:	Veränderungen der Chromatinorganisation in <i>SUVH2</i> -Überexpressionspflanzen während der Blattseneszenz.....	58
Abbildung III-15:	Histonmodifikationsmuster an <i>SAG12</i> in reifem und seneszentem Blattmaterial der <i>SUVH2-oe</i> Linie.....	63

Abbildung III-16:	Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an <i>SAG12</i> für den WT sowie die <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	64
Abbildung III-17:	Histonmodifikationsmuster an <i>ANAC083</i> in reifem und seneszentem Blattmaterial der <i>SUVH2</i> -oe Linie.....	66
Abbildung III-18:	Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an <i>ANAC083</i> für den WT sowie die <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	67
Abbildung III-19:	Histonmodifikationsmuster an <i>WRKY53</i> in reifem und seneszentem Blattmaterial der <i>SUVH2</i> -oe Linie.....	69
Abbildung III-20:	Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an <i>WRKY53</i> für den WT sowie die <i>SUVH2</i> -oe-Linie während der Seneszenz.....	70
Abbildung III-21:	DNA-Methylierungsprofile von <i>WRKY53</i> -I im WT und <i>SUVH2</i> -oe an reifem und seneszentem Blattmaterial.....	71
Abbildung III-22:	DNA-Methylierungsprofile von <i>WRKY53</i> -II im WT und <i>SUVH2</i> -oe an reifem und seneszentem Blattmaterial.....	72
Abbildung III-23:	DNA-Methylierungsprofile von <i>WRKY53</i> -III im WT und <i>SUVH2</i> -oe an reifem und seneszentem Blattmaterial.....	73
Abbildung III-24:	Venn-Diagramm der seneszenzabhängig im WT und der <i>SUVH2</i> -oe-Linie differentiell regulierten Gene.....	76
Abbildung III-25:	Verhältnisse von differentiell regulierten Genen in den untersuchten Entwicklungsstadien NS und S1 zwischen dem WT und der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	77
Abbildung III-26:	<i>k-Means</i> Clusteranalysen der im WT seneszenzabhängig regulierten Faktoren (SARFs).....	81
Abbildung III-27:	Expressionsprofile der zehn Cluster 2 Top-Kandidatengene in WT und <i>SUVH2</i> -oe-Pflanzen.....	84
Abbildung III-28:	Expressionsprofile der zwei Cluster 3 und 5 Kandidatengene in WT und <i>SUVH2</i> -oe-Pflanzen.....	86
Abbildung III-29:	Vergleich des Anteils putativer HY5-Zielgene an seneszenzabhängig regulierten Genen (SARFs) und nicht seneszenzabhängig regulierten Genen.....	87
Abbildung III-30:	Expressionsprofil von <i>HY5</i> in WT und <i>SUVH2</i> -oe-Pflanzen.....	88
Abbildung III-31:	Vergleich des Anteils EAR-Motiv kodierender Gene an seneszenzabhängig regulierten Genen (SARFs) und nicht seneszenzabhängig regulierten Genen.....	89
Abbildung III-32:	Expression der <i>SUVH</i> -Gene während der Seneszenz im WT und in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie	94
Abbildung IV-1:	Der Einfluss von Chromatinmodifikationen auf die Expression von Seneszenzmarkergenen in Arabidopsis WT- und <i>SUVH2</i> -Überexpressionspflanzen während der Seneszenz.....	110
Abbildung IV-2:	Schematische Darstellung der clusterspezifischen Veränderungen der SURF-Expression in <i>SUVH2</i> -oe-Pflanzen im Vergleich zum WT.	115
Abbildung V-1:	Darstellung repräsentativer Arabidopsis Rosettenblätter (jeweils Blatt 6) unterschiedlicher Entwicklungsstadien.....	124
Abbildung A-1:	ChIP-Analysen für die Auswahl von putativen Referenz-DNA-Bereichen.....	XI
Abbildung A-2:	Bestimmung der relativen Expression von <i>TUA4</i> während der Seneszenz.....	XII
Abbildung A-3:	Relative Veränderungen von H3K27me3 an Referenzgenen für	

	den WT während der Seneszenz.....	XII
Abbildung A-4:	Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern von Arabidopsis im WT.....	XIII
Abbildung A-5:	ChIP-Analysen der Referenz-DNA-Regionen in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie.....	XIV
Abbildung A-6:	Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern der <i>SUVH2</i> -oe-Linie und des WT.....	XV
Abbildung A-7:	Ergebnisse der genomweiten H3K27me3-ChIP-seq-Analysen für die <i>SAG12</i> -Genregion von Brusslan et al. (2012).....	XV
Abbildung A-8:	DNA-Methylierungsprofile von <i>ELF5A-3</i> im WT und <i>SUVH2</i> -oe an reifem und seneszentem Blattmaterial.....	XVI
Abbildung A-9:	DNA-Methylierungsprofile von <i>MULE</i> im WT und <i>SUVH2</i> -oe an reifem und seneszentem Blattmaterial.....	XVI

- TABELLENVERZEICHNIS -

Tabelle III.1:	Untersuchungen des Seneszenzverlaufs von <i>loss-of-function</i> und <i>gain-of-function</i> -Linien chromatinassoziierter Faktoren.....	45
Tabelle III.2:	Überrepräsentationsanalyse der Transkriptionsfaktorfamilien in WT und <i>SUVH2-oe</i> Pflanzen.....	78
Tabelle III.3:	Top 10 Kandidatengene aus Cluster C2.....	82
Tabelle III.4:	Verteilungsmuster der 383 SARFs innerhalb der Cluster C1-C5, die entweder für putative HY5-Zielgene oder EAR-Motiv enthaltende Proteine kodieren.....	89
Tabelle III.5:	Verteilungsmuster der für HY5-Zielgene oder EAR-Motiv kodierenden SARFs innerhalb der untersuchten Genfamilien mit regulatorischer Funktion.....	90
Tabelle III.6:	Der Einfluss der <i>SUVH2</i> -Überexpression auf die Expression der putativen HY5-Zielgene unter den SARFs.....	91
Tabelle III.7:	Der Einfluss der <i>SUVH2</i> -Überexpression auf die Expression EAR-Motiv kodierender SARFs.....	92
Tabelle V.1:	Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Vektoren.....	122
Tabelle V.2:	Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme....	122
Tabelle V.3:	Auflistung der Komponenten für Kolonie-PCR Analysen.....	125
Tabelle V.4:	Reaktionsschritte für die Kolonie-PCR Analysen.....	126
Tabelle V.5:	Auflistung der Komponenten für PCR-Analysen zur Überprüfung der T-DNA-Insertion.....	126
Tabelle V.6:	Reaktionsschritte für PCR-Analysen zur Überprüfung der T-DNA-Insertion.....	126
Tabelle V.7:	Auflistung der Komponenten für Gradienten-PCR-Analysen.....	127
Tabelle V.8:	Reaktionsschritte für Gradienten-PCR-Analysen.....	127
Tabelle V.9:	Auflistung der Komponenten für die Digoxigenin-Markierungs-PCR.	127
Tabelle V.10:	Reaktionsschritte für die Digoxigenin-Markierungs-PCR.....	127
Tabelle V.11:	Auflistung der Komponenten für die Reamplifikations-PCR mittels TrueStart HS <i>Taq</i> DNA Polymerase.....	128
Tabelle V.12:	Reaktionsschritte für die Reamplifikations-PCR mittels TrueStart HS <i>Taq</i> DNA Polymerase.....	128
Tabelle V.13:	Auflistung der Komponenten für die Reamplifikations-PCR -Analysen mittels KAPAHiFi Uracil+ Polymerase.....	128
Tabelle V.14:	Reaktionsschritte für für die Reamplifikations-PCR-Analysen mittels KAPAHiFi Uracil+ Polymerase.....	128
Tabelle V.15:	Auflistung der Komponenten für qRT-PCR-Analysen.....	131
Tabelle V.16:	Reaktionsschritte für qRT-PCR-Analysen.....	132
Tabelle V.17:	Auflistung der in den ChIP-Analysen verwendeten Antikörper gegen Histonmodifikationen und die zugehörigen Referenz-DNA-Bereiche.....	135
Tabelle A.1:	Auflistung der ausgewählten putativen DNA-Referenzbereiche für die Normalisierung der SAG-CHIP-Daten.....	X
Tabelle A.2:	Gegenüberstellung aller im WT und/oder in der <i>SUVH2-oe</i> -Linie differentiell regulierten Gene der TF-Plattformanalysen.....	XVII

- ZUSAMMENFASSUNG -

Die Blattseneszenz ist die letzte Phase der Blattentwicklung und geht mit massiven Veränderungen der Genexpression einher. Für andere pflanzliche Entwicklungsprozesse ist bekannt, dass der Chromatinstatus eine wichtige Rolle innerhalb der Kontrolle der Genexpression spielt.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es auch während der Blattseneszenz zu Veränderungen der Chromatinstruktur kommt und ob diese einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression haben könnten. Da zu Beginn der Arbeit kaum Informationen über den Zustand des Chromatins in seneszenten Blattgeweben vorlagen, erfolgte im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* die Analyse des Chromatins auf globaler und lokaler Ebene. Dabei konnten immunozytologische Analysen zeigen, dass es während der Seneszenz zu deutlichen Veränderungen euchromatischer und insbesondere heterochromatischer Bereiche des Chromatins in Interphasezellkernen kommt. Des Weiteren konnte über Chromatinimmunopräzipitation festgestellt werden, dass an Seneszenzmarkergenen während der Seneszenz Histone modifiziert und damit Veränderungen des Chromatinstatus etabliert werden, die mit einer gesteigerten Expression dieser Gene korrelieren. Insbesondere für *WRKY53*, einem Gen, das für einen zentralen Regulator der Blattseneszenz kodiert, konnte ein signifikanter Anstieg aktivierender Histonmodifikationen zeitgleich mit der Induktion der Genexpression während der Seneszenz festgestellt werden. Die Etablierung dieser aktivierenden Chromatinmodifikationen ist in Pflanzen vollständig supprimiert, die die putative Histonmethyltransferase SUVH2 überexprimieren. Des Weiteren werden in diesen Pflanzen repressive Histonmethylierungen an *WRKY53* assoziierten Histonen etabliert. Die Veränderungen der lokalen Histonmodifizierungen an *WRKY53* in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen spiegeln sich dabei interessanterweise in einer vollständigen Unterdrückung der seneszenzabhängigen Expression dieses Gens wider. Für diese Pflanzen konnte zudem sowohl auf physiologischer als auch molekularer Ebene eine deutliche Verzögerung der Blattseneszenz festgestellt werden. Darüber hinaus ergaben immunozytologische Untersuchungen der SUVH2-Überexpressionspflanzen eine vollständige Suppression der im WT während der Seneszenz induzierten globalen Chromatinveränderungen. Durch vergleichende Expressionsanalysen von über 1800 Genen, die für regulatorische Faktoren kodieren, zwischen WT- und SUVH2-Überexpressionspflanzen gelang es weiterhin, eine Vielzahl von Genen zu identifizieren, die wie *WRKY53* eine veränderte Genexpression in den transgenen Pflanzen aufweisen. Diese Untersuchungen zeigten, dass etwa 50% der seneszenzassoziierten regulatorischen Faktoren in ihrem Expressionsverhalten in SUVH2-Überexpressionspflanzen beeinflusst sind. Die gezielte Betrachtung der Expressionsmuster dieser Gene konnte aufzeigen, dass die Überexpression von SUVH2 dabei unterschiedliche Konsequenzen auf die Expression der Gene hat und wahrscheinlich spezifisch auf bestimmte Genfamilien wirkt. Weiterhin wurde festgestellt, dass insbesondere Zielgene des bZIP Transkriptionsfaktors HY5 sowie EAR-Motiv

kodierende Gene eine veränderte Expression in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen während der Seneszenz aufweisen. Diese Daten indizieren, dass HY5 und EAR-Motiv-Proteine eine zentrale Rolle in der Steuerung seneszenzassoziierter Prozesse haben und dass die Regulation der Expression dieser Gene unter der Kontrolle des Chromatinstatus steht.

Zusammenfassend unterstützen die erhaltenen Daten meiner Arbeit ein Model, in dem pflanzliche Seneszenzprozesse durch ein vielschichtiges Netzwerk verschiedener Chromatinveränderungen kontrolliert sein könnten. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher noch unbekannt und müssen in zukünftigen Arbeiten aufgeklärt werden.

- SUMMARY -

Leaf senescence as the last developmental stage of a leaf is realized via massive changes in gene expression. Previous studies in other plant developmental stages suggest a role of chromatin alterations in controlling parts of these gene expression changes.

The main objective of this thesis was to investigate if alterations in chromatin structure also occur during leaf senescence and if these changes could influence the regulation of associated gene expression. Since there was only limited information about chromatin states during senescence in plants, global and local analyses of the chromatin structure in the model plant *Arabidopsis thaliana* were performed. In immunocytological studies distinct alterations of euchromatic, but in particular heterochromatic regions in senescing interphase nuclei could be ascertained. Furthermore changes of histone modifications at senescence marker genes were observed via chromatin immunoprecipitation correlating with the corresponding expression patterns of these genes. In particular, at the *WRKY53* gene, which encodes a central regulator of leaf senescence, a significant increase of activating histone modifications was observed during senescence, when expression of this gene was induced. Interestingly, the establishment of the activating marks at *WRKY53* is completely suppressed in plants overexpressing the putative histone methyltransferase *SUVH2*. Moreover, repressive histone marks were enriched at this gene in these plants, which corresponds to a suppressed upregulation of *WRKY53* expression during leaf senescence. In accordance with the inhibition of the *WRKY53* induction a strong delay of leaf senescence was determined by physiological analyses for these transgenic plants. Beyond that, a complete suppression of senescence-specific global chromatin alterations which could be determined in wild type plants was observed. Subsequently, the *SUVH2* overexpressing plants were exploited as a tool to identify other regulatory factors, which are also impaired in their senescence-associated expression. Therefore a large-scale comparative expression analysis of about 1800 regulatory factors between mature and senescent leaves of wild type and *SUVH2* overexpressing plants was performed. These investigations yielded impairment of the senescence-specific regulation of about 50 % of all investigated regulatory factors by the strong and constant overexpression of *SUVH2*. Via clustering analyses distinct patterns of affected expression of these genes as a consequence of *SUVH2* overexpression were identified. In addition, specific gene families are affected differentially in wild type and *SUVH2* overexpressing plants, which suggests a direct or indirect locus-specific mode of *SUVH2* action. Interestingly, a distinct proportion of the identified senescence-associated genes possess an ERF-associated amphiphilic repression motif (EAR motif). The EAR motif is the most prominent repressor motif in plants, which indicates that EAR motif-mediated transcriptional repression could be a principal mechanism within regulation of senescence. Furthermore, about 30 % of the senescence-related genes are predicted as putative targets of the bZIP transcription factor HY5. This suggests that HY5-dependent processes play an

important role within the regulatory network of leaf senescence. Moreover, these processes seem to be specifically affected in plants overexpressing SUVH2.

Taken together, the results of my thesis give new insights into the complex regulatory network of senescence-associated processes and the involvement of a multi-faceted network of chromatin alterations. The exact mode of action through which chromatin modifying factors control global and local chromatin structure and by this also gene expression at different developmental stages have to be clarified in future experiments.

- I. EINLEITUNG -

I.1 Alterungs- und Zelltodprozesse.

Das biologische Altern und Zelltodprozesse sind allgegenwärtige und elementare Komponenten von Entwicklungskreisläufen in allen mehrzelligen Organismen. Man unterscheidet dabei im Allgemeinen passive Alterungsprozesse, die als zeitabhängige Anhäufung von Abnutzungserscheinungen betrachtet und durch äußere Bedingungen verursacht werden, von kontrollierten Zelltodprozessen, bei denen die Initiation und Progression reguliert und unter Kontrolle einer genetischen Steuerung abläuft (Noodén et al. 1997). Auch die endogen kontrollierten Zelltodprozesse sind dabei oft durch Umweltfaktoren beeinflussbar. Die zeitlich abhängig sinkende Viabilität von Samen ist ein prominentes Beispiel für einen passiven Alterungsmechanismus. Endogen und exogen regulierter Zelltod als finale Folge eines eingeleiteten Selbstzerstörungsprozesses wird im Allgemeinen unter dem Begriff des „Programmierten Zelltodes“ (PCD; *programmed cell death*) zusammengefasst. Funktionell dienen diese Prozesse vor allem der Strukturbildung, der Reproduktion und/oder der Akklimatisierung an externe Bedingungen und können dabei vom Zelltod einzelner Zellen bis hin zum Absterben ganzer Organismen reichen. PCD-Prozesse in Pflanzen sind z. B. die „Hypersensitive Reaktion“ (HR) bei Inkompatibilität eines Pflanzenpathogens mit einer Pflanze, die strukturelle Bildung von bestimmten Organen oder auch die Seneszenz von Blättern oder Früchten. Unter den PCD-Prozessen nehmen Seneszenzprozesse allerdings eine Sonderstellung ein. So laufen pflanzliche Seneszenzprogramme über einen deutlich längeren Zeitraum ab als alle anderen Zelltodprozesse. Weiterhin sind Seneszenzprozesse oft bis in späte Phasen hinein revertierbar. Darüber hinaus kommt es zwar in der Konsequenz immer zu einem programmierten Absterben von Zellen, jedoch bleiben über lange Phasen der Seneszenzprozesse typische, funktionell wichtige Gene, die die eigentlichen Zelltodprozesse regulieren, reprimiert und werden erst in späten Stadien aktiviert (Reape und McCabe 2008). So gibt es in der aktuellen Diskussion um die Zuordnung der Seneszenz zu PCD-Prozessen auch einige Gegenstimmen, die die Seneszenz als einen eigenständigen, dem PCD vorgeschalteten Entwicklungsabschnitt definieren, der letztlich in den eigentlichen PCD übergeht (Delorme et al. 2000; Thomas et al. 2003).

I.2 Seneszenz der Pflanzen.

Pflanzliche Seneszenzprozesse sind essentielle Bestandteile der Entwicklung mehrzelliger Pflanzen und sind durch eine Reihe von metabolischen Veränderungen gekennzeichnet, die sich während der finalen Stadien von Entwicklungsprozessen ereignen und im programmierten Tod einer Zelle, eines Gewebes, Organs oder gar der gesamten Pflanze kulminieren. Wie bei allen PCD-Prozessen, handelt es sich auch bei der pflanzlichen Seneszenz um einen geordneten, genetisch gesteuerten Vorgang. Dabei kommt es sowohl zur Repression einer Vielzahl von vor allem photosynthetisch funktionellen Genprodukten als auch zur Neusynthese bzw. gesteigerten Synthese von mRNAs und

Proteinen (Brady 1988; Smart 1994). Im Pflanzenreich kann man Seneszenzprozesse auf verschiedenen Ebenen betrachten. So werden sie unter anderem, hinsichtlich des Einflusses der Reproduktion auf die Seneszenzmuster, in die monokarpische und die polykarpischen Seneszenz unterschieden (Leopold 1961). Bei der monokarpischen Form kommt es zum Absterben der gesamten Pflanze mit Ausnahme der Samen. Es handelt sich folglich um eine dramatische und sehr komplexe Form der Seneszenz, bei der sich einer Reproduktionsphase der Tod der gesamten Pflanze anschließt. Zumeist durchlaufen ein- und zweijährigen Pflanzen wie z. B. die Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Ackerschmalwand), *Hordeum vulgare* L. (Gerste) oder *Glycine max* (L.) Merr. (Sojabohne) diese Seneszenzform. In der Regel hängt dabei die Induktion der monokarpischen Seneszenz vor allem von der Ausbildung der jeweiligen reproduktiven Einheiten ab (Noodén et al. 1997). Allerdings ist *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) hier eine Ausnahme, da diese Spezies keine oder nur eine geringe Abhängigkeit der Induktion der Seneszenz von der Bildung reproduktiver Einheiten aufzuweisen scheint (Hensel et al. 1993; Noodén und Penney 2001). Mehrjährige Pflanzen durchlaufen innerhalb ihrer Entwicklung die polykarpische Form der Seneszenz, bei der sich der Reproduktionsphase das Absterben einzelner Pflanzenteile wie der Blätter, jedoch nicht der gesamten Pflanze, anschließt. Ein bekanntes Beispiel für diesen Seneszenztyp ist der herbstliche Laubfall perennierender Laubbäume der gemäßigten Klimazonen. Unabhängig von der Lebensdauer sowie der Abhängigkeit von der Reproduktion der Pflanzen, kann man Seneszenzprozesse auch auf Organebene unterscheiden. Die prominentesten Beispiele dafür sind die Seneszenz von Blüten, Früchten oder Blättern. Blätter sind die Organe, die höhere Pflanzen als autotrophe Lebewesen charakterisieren. Ihre photosynthetische Leistung und die damit verbundene Fähigkeit Kohlenstoff unter Verwendung von Lichtenergie zu fixieren, ist die Grundlage für die tierische und menschliche Ernährung. Daraus resultiert, nicht nur für die Pflanze selbst, sondern auch für den Menschen sowie einer Vielzahl weiterer tierischer Lebewesen, eine besondere physiologische Bedeutung der gesamten Entwicklung dieser Organe und damit auch der Blattseneszenz.

1.3 Die Blattseneszenz.

Blätter sind photosynthetisch spezialisierte Organe, für deren Bildung die Pflanze große Mengen an Energie und Nährstoffen aufwendet. Ausgehend von den Blattprimordien stellen Blätter in der Phase des Blattwachstums sog. „sink“-Gewebe dar, bekommen also mehr energiereiche Makromoleküle zugeführt als sie selbst herstellen können. In der photosynthetisch aktiven Entwicklungsphase hingegen werden die Blätter zu einem sog. „source“-Gewebe und produzieren dabei mehr energiereiche Verbindungen als sie selbst benötigen. Diese „überschüssigen“ Nährstoffe können dann wiederum für den Aufbau von Folgeorganen genutzt werden. Mit Beginn der Seneszenzphase werden zusätzlich aus den seneszierenden Blättern die zuvor eingelagerten Ressourcen remobilisiert, d. h. zunächst zu Transportformen abgebaut und dann in „sink“-Gewebe

wie Folgeblätter oder Samen transportiert. Die aus den Blättern abtransportierten Zellinhaltsstoffe werden bei annuellen, also einjährigen Pflanzen letztendlich für die Bildung der Samen benötigt. Bei mehrjährigen Pflanzen werden sie in überdauernden Organen gespeichert und nachfolgend für die Ausbildung der Reproduktionsorgane oder neuer Blätter verwendet. Demnach handelt es sich bei der Blattseneszenz um eine Entwicklungsstrategie, die maßgeblich zur pflanzlichen Fitness und dem Überleben der Pflanze beiträgt. Das primäre Ziel der Blattseneszenz ist folglich nicht der Zelltod an sich, sondern das Recycling von Nährstoffen für die Ausbildung von Folgeorganen wie Folgeblättern, Blüten und/oder Samen.

Wie in Abbildung I-1 illustriert, kann die Seneszenz von Blättern in drei Phasen unterteilt werden (Noodén et al. 1997). Während der ersten Phase, die als Initiationsphase bezeichnet wird, kommt es zum Umschalten des Entwicklungsprogramms und ersten Veränderungen der Expression von Genen. In dieser Phase werden Wachstumsprozesse verzögert bzw. gänzlich gestoppt. In der sich anschließenden Progressionsphase, die auch als Reorganisations- bzw. Degenerationsphase bezeichnet wird, kommt es zu massiven Abbauprozessen wie z. B. zur Demontage der Photosyntheseapparate. Während dieser Phase erfolgen die aktive und gesteuerte Remobilisierung aller recycelfähigen Nährstoffe und deren Abtransport in "sink"-Organe. Dabei verändert sich die Expression einer Vielzahl von Genen. Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt, dem sog. "*point of no return*" (PNR), ist die Seneszenz des Blattes innerhalb dieser Phase durch Veränderungen von Umweltbedingungen reversibel (Zavaleta-Mancera et al. 1999; Thomas et al. 2003; Thomas und Donnison 2000; Thomas et al. 2003). Das dritte als terminale Phase oder Endphase bezeichnete Stadium der Blattseneszenz ist durch Mechanismen gekennzeichnet, die den eigentlichen Tod der Blattzellen einleiten. Dabei konnte für Arabidopsis gezeigt werden, dass es im letzten Stadium der Seneszenz zu Apoptose-ähnlichen Symptomen wie der Kondensation des Chromatins, zur DNA-Fragmentierung und zum kontrollierten Zusammenbruch der Vakuolen kommt (Noodén et al. 1997; Jones 2001; Ishida et al. 2008).

Eines der ersten von der Seneszenz betroffenen Organellen einer Blattzelle ist der Chloroplast. Schon bald nach Erreichen des Reifestadiums kommt es in Blättern bereits zu einem messbaren Abfall des Chlorophyllgehalts (Miersch et al. 2000). Im Gegensatz zu den Chloroplasten, ereignen sich strukturelle oder biochemische Veränderungen an anderen Organellen wie den Mitochondrien und dem Zellkern erst in späteren Phasen der Blattseneszenz (Smart 1994). Die Chloroplasten einer Zelle enthalten bis zu 75% des gesamten Blattstickstoffs, der wiederum bis zu 50% in der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) und zu etwa einem Drittel in den Proteinen der Lichtsammel- und Antennenkomplexe der Photosyntheseapparate gebunden vorliegen kann (Makino und Osmond 1991). Bei dem Abbau pigmenthaltiger Proteinkomplexe der Thylakoidmembran wie z. B. des LHCP II (*light harvesting complex protein II*) kommt es zur Entkopplung der Chlorophyll-Protein-Komplexe.

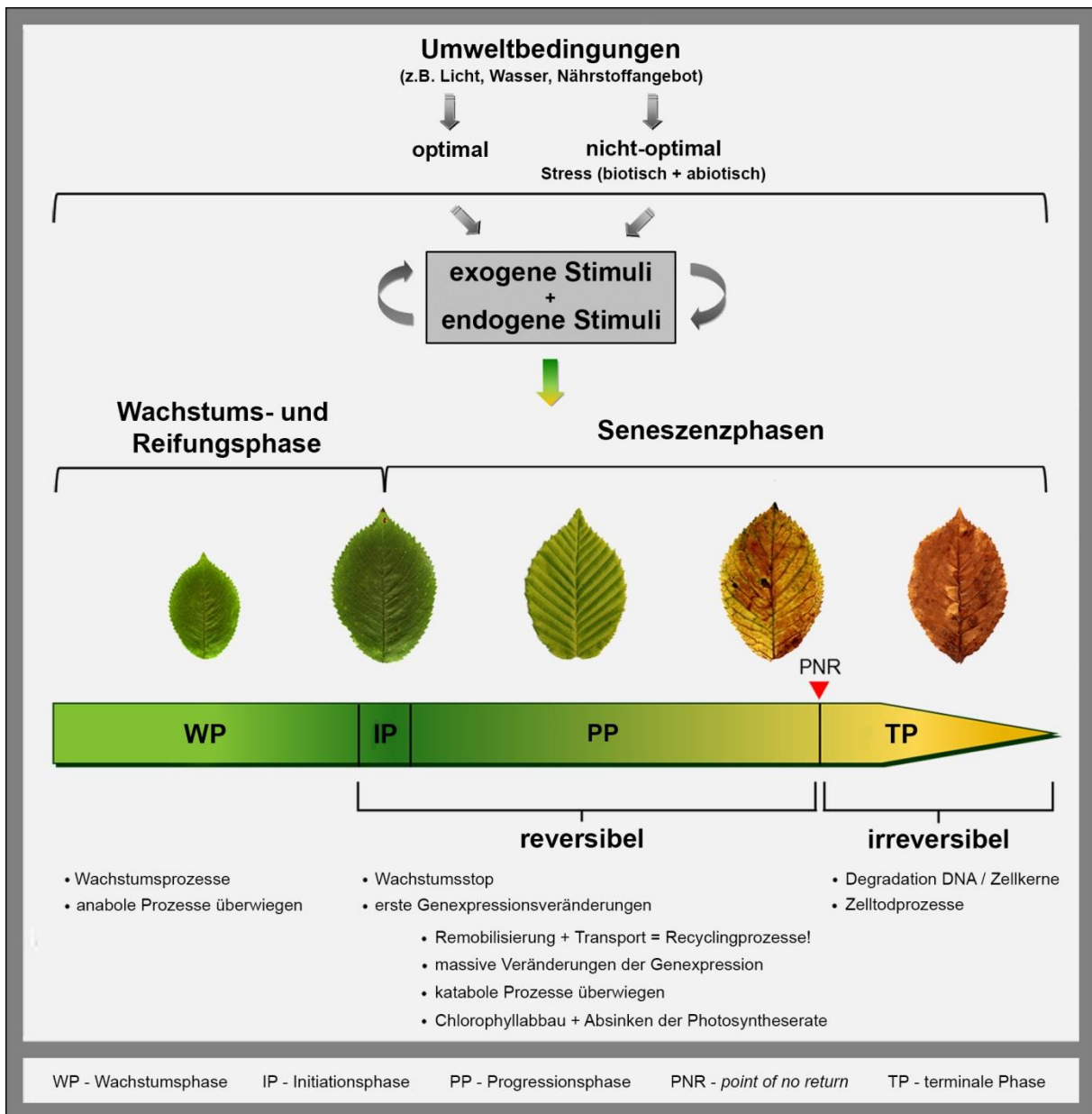


Abbildung I-1: Phasenmodell der Blattseneszenz und der Abhängigkeit von endo- sowie exogenen Einflussgrößen.

Dabei frei werdendes Chlorophyll würde stark zelltoxisch wirken, da es weiterhin fähig ist, Lichtenergie aufzunehmen, diese aber nicht an andere Akzeptoren weiterleiten kann. Folglich würde es zu einem deutlichen Anstieg von freien und angeregten Chlorophyllen kommen, die wiederum in der Lage sind, die Anregungsenergie auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Dadurch käme es zur Bildung des hoch reaktiven Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$). Diese Form des Sauerstoffs wirkt stark schädigend auf Makromoleküle wie Nukleinsäuren oder Proteine sowie auf Membranlipide. Bei einer unkoordinierten Degradation der Pigment-Proteinkomplexe, würde es aufgrund der phototoxischen Wirkung der Chlorophylle zum vorzeitigen Zelltod kommen und alle noch im Blatt gespeicherten Ressourcen würden damit verloren gehen. Pflanzen haben jedoch einen effizienten Chlorophyllabbauweg entwickelt (Hoertensteiner 2006; Eckardt 2009; Hoertensteiner 2013), der mit Beginn der Blattseneszenz angeschaltet wird und die Akkumulation von freien Chlorophyllmolekülen verhindert. Am Ende dieses Abbauweges werden die farblosen

Endprodukte als sog. NCCs (*non-fluorescent chlorophyll catabolites*) in der Vakuole eingelagert. Im Gegensatz zum Abbau der Proteinkomponenten der Lichtsammelkomplexe wird der enthaltene Stickstoff aus den Chlorophyllmolekülen nicht recycelt. Neben der Degradation von Thylakoidproteinen und dem damit gekoppelten Chlorophyllabbau, kommt es im Verlauf der Blattseneszenz zu einer Reihe weiterer katabolischer Prozesse wie z. B. dem Abbau von Stromaproteinen, Lipiden und Ribonukleinsäuren (Smart 1994; Lohman et al. 1994). Eine besonders wichtige Komponente für die Pflanze ist dabei der Stickstoff, der wie erwähnt zu 75% in den Chloroplasten in Form von Proteinen gespeichert vorliegt. Neben Stickstoff werden aber auch z.B. phosphor- und schwefelhaltige Verbindungen sowie Metalle für die Wiederverwertung recycelt (Himmelblau and Amasino 2001). Neben proteolytischen Prozessen spielt der Abbau von Membranen ebenfalls eine große Rolle innerhalb der Blattseneszenz. Charakteristisch für den Membranabbau in Blättern ist z.B. die Abnahme der chloroplastidären Lipide sowie die gleichzeitige Anreicherung von Fettsäuren, die wiederum für Energiegewinnungsprozesse verwendet werden können (Kaup et al. 2002; Watanabe et al. 2013). Während der Blattseneszenz kommt es ferner zum Abbau von Nukleinsäuren, vor allem von RNA (Brady 1988). Entsprechend steigt mit Beginn der Seneszenz die Aktivität von RNasen deutlich an. Dies konnte u. a. für die RNasen RNS2 (*S-like* Ribonuklease 2) und BFN1 (Bifunktionelle Nuklease 1) aus *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Taylor et al. 1993; Perez-Amador et al. 2000). Obwohl man mittlerweile wie oben ausgeführt eine Vielzahl von an der Seneszenz beteiligten Faktoren kennt, besteht bezüglich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zur Remobilisierung und zum Transport der Nährstoffe sowie Bezug nehmend auf die Umsetzung des finalen Zelltodes, noch ein enormer Aufklärungsbedarf. Zudem gibt es bisher nur wenige Hinweise darauf wie das komplexe Wirken der einzelnen Seneszenzprozesse reguliert und verknüpft wird.

1.3.1 Induktion und Regulation der Blattseneszenz.

Die Blattseneszenz als finales Stadium der Blatentwicklung verläuft genetisch gesteuert und umfasst die komplexe und koordinierte Verknüpfung des biologischen Alters der Pflanze sowie dem Entwicklungsstand des Blattes selbst mit den Wirkungen einer Vielzahl endogener Faktoren wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; engl. "*reactive oxygen species*"), Phytohormonen oder anderen signalgebenden Komponenten wie Stickstoffmonoxid oder Metaboliten (zusammengefasst z.B. in Guo und Gan 2005; Lim et al. 2007a; Guo 2013; Woo et al. 2013). Neben diesen endogenen Einflüssen tangiert zudem eine Vielzahl exogener Faktoren den Verlauf der Blattseneszenz. Dabei kann man zwischen biotischen, also den Befall der Pflanze mit Pathogenen und abiotischen Seneszenz beeinflussenden Faktoren unterscheiden (Zhou und Gan 2009; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Lim et al. 2007a). Zu den abiotischen Faktoren zählen z.B. Nährstoff-, Licht- oder auch Wasserangebot. Eine suboptimale Verfügbarkeit dieser Faktoren oder auch andere schädliche Einflüsse wie Ozon oder UV-B-Strahlung können zu einem verfrühtem Einsetzen und/oder einer

Beschleunigung von Seneszenzprozessen führen (s. Abb. I-1). Die Pflanzen haben also Mechanismen entwickelt, die es ihnen als sessile Organismen erlauben, in Abhängigkeit und in Kommunikation mit ihrer Umwelt, Seneszenzprozesse einzuleiten und zu beschleunigen. Durch diese Adaptation ist die Pflanze in der Lage, ihren Lebenszyklus inklusive der generativen Phase trotz widriger Umweltbedingungen zu komplettieren.

I.3.1.1 Molekulargenetische Regulation der Blattseneszenz.

Die komplexen Abläufe der Blattseneszenz stehen unter der Kontrolle eines kernkodierten, genetisch regulierten Entwicklungsprogrammes, das eine aktive Genexpression erfordert (Noodén und Leopold 1988; Gan und Amasino 1997). In den letzten Jahren konnte eine Fülle von mehreren tausend Genen, die eine veränderte Genexpression während der Blattseneszenz aufweisen, mittels Mutantanalysen, differentiellen Screeningmethoden sowie einer Vielzahl von Transkriptomanalysen vor allem in der Modellpflanze *Arabidopsis* identifiziert werden (z.B. Becker und Apel 1993; Smart et al. 1995; Park et al. 1998; Buchanan-Wollaston et al. 2003; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Breeze et al. 2011; Gepstein et al. 2003). Diese Untersuchungen spiegeln die Komplexität der molekularen Prozesse, die während der Seneszenz ablaufen wider.

I.3.1.1.1 Genexpression während der Blattseneszenz.

Während der Seneszenz von Pflanzen reprimierte Gene werden im Allgemeinen als SDGs (*senescence down regulated genes*) bezeichnet. Die entsprechend kodierten Genprodukte haben dabei zumeist anabole Funktionen. Gene, deren Expression während der Seneszenz verstärkt ist, werden dagegen als SAGs (*senescence associated genes*) bezeichnet und ihre Genprodukte sind häufig funktionell in katabolen Prozessen involviert. Wie bereits erwähnt, stehen die Induktion sowie der Ablauf der entwicklungsabhängigen Seneszenzprozesse unter der Kontrolle einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren. Korrespondierend dazu, ergaben weitreichende Analysen der Expressionsprofile einer Vielzahl von SAGs unter verschiedenen seneszenzinduzierenden Stressbedingungen, zum Teil eine stressabhängige Regulation der Genexpression (Park et al. 1998; Miller et al. 1999; Weaver et al. 1998; John et al. 2001; Chen et al. 2002; Robatzek und Somssich 2001). So scheint die differentielle Genexpression eine zentrale Rolle innerhalb der Konvertierung exogener und endogener Signale in den entwicklungsabhängigen Prozess der Blattseneszenz einzunehmen. Dies wird durch eine neuere vergleichende Transkriptomanalyse gestützt, die zeigt, dass die differentielle Expression einer Vielzahl von Genen während der Blattseneszenz durch verschiedene externe und interne Faktoren beeinflusst ist (Guo und Gan 2012). So müssen wie in Abbildung I-2 schematisch dargestellt, endogene und exogene Signale von den Pflanzen perzipiert, mit entwicklungsabhängigen Signalen verschaltet und über Signaltransduktionskaskaden weitergeleitet werden. Im Zellkern kommt es dann zu den seneszenztypischen massiven Veränderungen der Genexpression. Untersuchungen von Guo et al. (2004) konnten eine alternierende Expression von weit über 2400 Genen während der

Seneszenz in Arabidopsis zeigen. In einer neueren Transkriptomstudie, die an einer umfassenden Seneszenzkinetik durchgeführt wurde, konnte sogar für weit mehr als 6000 Gene eine veränderte Expression nachgewiesen werden (Breeze et al. 2011). Die entsprechend synthetisierten Genprodukte sind dann an der Weiterführung und Finalisierung der seneszenzassoziierten Degradations- und Recyclingprozesse beteiligt. Die Vielzahl der endogenen Steuerungseinheiten sowie der verschiedenen exogenen Einflussgrößen auf den Verlauf der Seneszenz sprechen für ein vielschichtiges Netzwerk zur Induktion der Blattseneszenz sowie eine Überlappung der Regulationsmechanismen der stress- und der entwicklungsabhängigen Seneszenz (He et al. 2001).

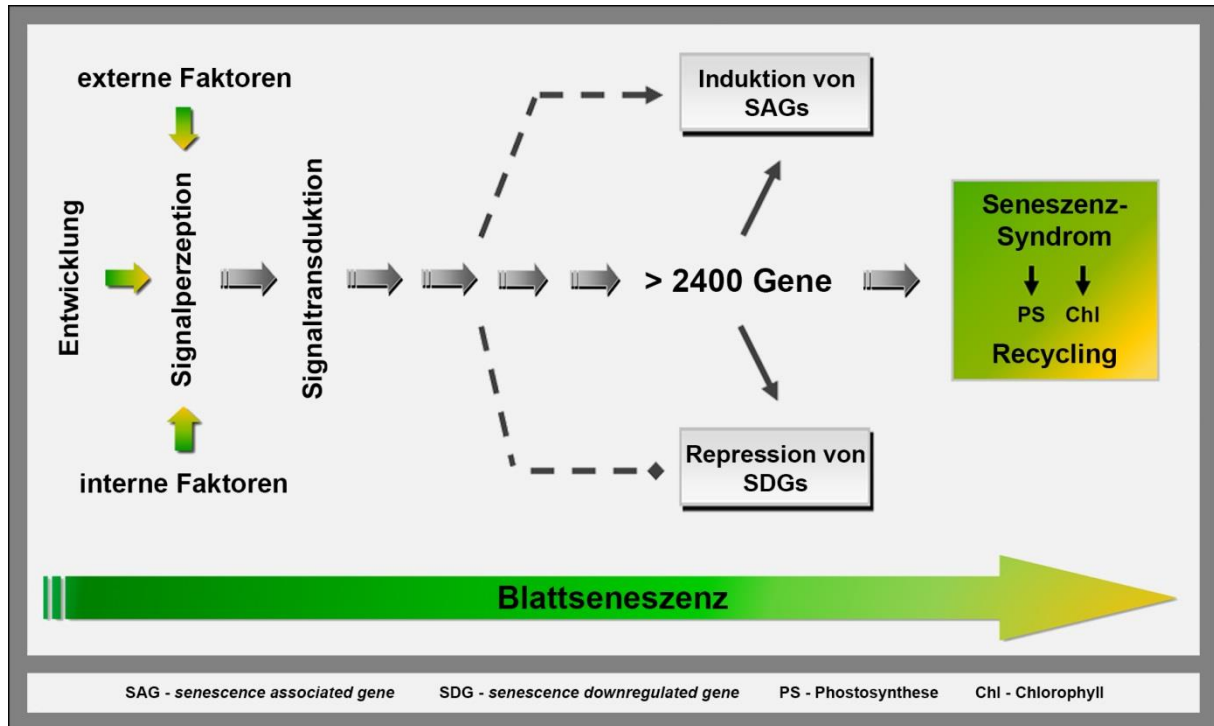


Abbildung I-2: Schematische Darstellung der Initiation und Regulation der Blattseneszenz.

Obwohl man bereits eine Vielzahl von Komponenten der komplexen Regulationskaskaden identifizieren konnte, sind die molekularen Mechanismen der Steuerung der Blattseneszenz noch vielfach unverstanden. In den letzten Jahren akkumulierten jedoch Hinweise, dass Phytohormone eine wichtige Rolle als frühe regulatorische Integratoren der stress- und entwicklungsabhängigen Seneszenz spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sie in der Regel voneinander abhängig und in einem stark verknüpftem Netzwerk agieren (Gepstein und Glick 2013; Jibrán et al. 2013). Diese komplexen Phytohormonwirkungen könnten in Zusammenarbeit mit anderen Signalintegratoren und regulatorischen Mechanismen zu den massiven Veränderungen der Expression von Genen, die entweder für regulatorische Komponenten oder funktionelle Faktoren des Seneszenzprogrammes kodieren, führen.

I.4 Verschiedene Ebenen der Regulation der Genexpression.

Während pflanzlicher Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse müssen Pflanzen eine Vielzahl von gewebs-, entwicklungs- und umweltspezifischen Signalen miteinander verknüpfen, um ihre

zeitliche und räumliche Genexpression zu steuern. Dabei wird die Genexpression auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Neben posttranskriptionellen, translationellen und posttranslationellen Mechanismen spielt vor allem die Regulation der Transkription eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Bildung funktioneller Genprodukte (Abbildung I-3).

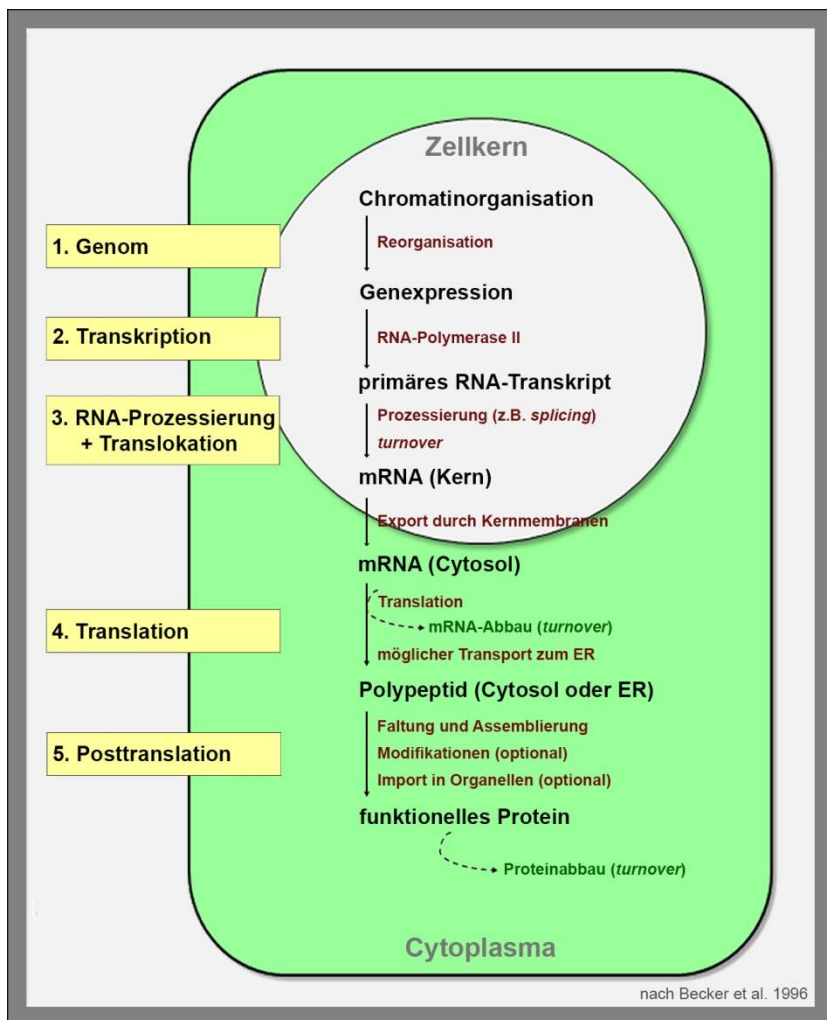


Abbildung I-3: Ebenen der Regulation der Expression eukaryotischer Gene.

1. Genomebene. Solche Prozesse umfassen die Genamplifikation sowie die Reorganisation der Chromatinstruktur.
2. Transkriptionelle Kontrolle.
3. RNA-Prozessierung und RNA turnover im Zellkern sowie die Translokation aus dem Zellkern heraus.
4. Kontrolle der Translation, einschließlich des möglichen Transportes in das endoplasmatische Retikulum (ER).
5. Posttranslationale Kontrolle. Solche Prozesse umfassen den cytosolischen mRNA turnover, die Faltung und Assemblierung der Proteine sowie mögliche Modifikationen und den optionalen Transport der Proteine in Organellen.

(Modell modifiziert nach Becker et al. 1996)

Auf dieser transkriptionellen Ebene steht die räumliche und zeitliche Steuerung der Genexpression wiederum unter der Kontrolle verschiedener und sich beeinflussender Mechanismen wie der Bindung von Transkriptionsfaktoren an korrespondierende regulatorische *cis*-Elemente der DNA sowie übergeordneten und lokalen Veränderungen der Chromatinstruktur. Die Wichtigkeit der Regulation durch die Kontrolle der Transkriptionsinitiation in Pflanzen wird u. a. durch den großen prozentualen Anteil des Genoms reflektiert, der für Transkriptionsfaktoren kodiert. So zeigten Analysen des Arabidopsisgenoms, dass von den über 27000 proteinkodierenden Genen, die das etwa 125 Mbp (Millionen Basenpaare) große Genom umfasst (The Arabidopsis Genome Initiative 2000; Mitsuda und Ohme-Takagi 2009), mehr als 2000 für Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Faktoren der Transkription kodieren (Guo et al. 2005; Perez-Amador et al. 2000; Pérez-Rodríguez et al. 2010; Riechmann et al. 2000; Iida et al. 2005; Davuluri et al. 2003). In tierischen Systemen mit einer vergleichbaren Genomgröße ist die Anzahl von Genen, die für solche Proteine kodieren, im Gegensatz dazu deutlich geringer (Riechmann et al. 2000).

I.4.1 Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren.

Um die Transkription eines Gens durch die RNA-Polymerase II zu initiieren, ist ein Proteinkomplex, der sich u. a. aus sog. generellen Transkriptionsfaktoren zusammensetzt, obligatorisch. Zusätzlich können andere regulatorische Proteine die Transkriptionsrate ihrer Zielgene in Abhängigkeit von exogenen und endogenen Stimuli sowie immanenten Entwicklungssignalen erhöhen oder verringern. Solche Proteine sind z.B. Transkriptionsfaktoren (TFs), die über die spezifische Bindung an *cis*-Elemente in Promotoren von Zielgenen wirken oder andere Faktoren (TRs; *transcriptional regulators*), die über Protein-Protein-Interaktionen oder Chromatinremodeling auf die Transkription wirken können. Wie bereits erwähnt, gibt es in Pflanzen eine sehr hohe Anzahl von Genen, die für TFs und TRs kodieren. Diese können anhand ihrer Struktur und/oder auf Basis der Art ihrer DNA-Bindedomäne in verschiedene Proteinfamilien klassifiziert werden. In Arabidopsis z.B. wurden die über 2000 TFs und TRs anhand ihrer charakteristischen Domänen in etwa 60 TF-Familien (Jin et al. 2014; Pérez-Rodríguez et al. 2010) sowie 24 TR-Familien (Pérez-Rodríguez et al. 2010) gruppiert. TFs können in der Regel entweder als Aktivatoren oder Repressoren agieren. Allerdings wurden sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Systemen TFs identifiziert, die in Abhängigkeit von Umweltfaktoren oder ihrer Zielgene bifunktionell, d.h. sowohl aktivierend als auch reprimierend, wirken können (Adkins et al. 2006; Ceribelli et al. 2008; Miao et al. 2004; Ikeda et al. 2009). Für eine koordinierte Genfunktion kann ein TF oft an verschiedene Zielgene binden, wobei jedes Gen wiederum durch verschiedene TFs kontrolliert wird. So entstehen vielschichtige Netzwerke, die in dynamischen und komplexen Genexpressionsmustern, in Antwort auf Veränderungen durch endogene und exogene Stimuli, resultieren. Zusätzlich steht die Aktivität der TFs selbst oft unter transkriptioneller Kontrolle durch andere TFs oder wird auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Durch diese kombinatorischen Mechanismen kann ein und derselbe TF multiple Funktionen haben und für die Regulation von Genen in Abhängigkeit von distinkten Signalen verantwortlich sein.

I.4.1.1 Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren während der Seneszenz.

Die meisten der identifizierten Gene mit einer verstärkten Expression während der Blattseneszenz kodieren für Faktoren des seneszenzassoziierten Degradations- und Recyclingmetabolismus. Dennoch konnten in den letzten Jahren viele Gene mit möglicher regulatorischer Funktion, wie Komponenten der Signaltransduktion oder TFs und TRs, durch verschiedene Expressionsstudien identifiziert werden (z.B. Guo et al. 2004; Balazadeh et al. 2008; Breeze et al. 2011). Bei den meisten dieser regulatorischen Faktoren handelte es sich um für TFs kodierende Gene. Bislang konnten z.B. in Arabidopsis weit mehr als 100 solcher TFs identifiziert werden. Diese sind über 20 verschiedenen Familien, insbesondere der WRKY-, NAC-, C2H2 Zinkfinger-, MYB- und AP2-EREBP-TF-Familien zugehörig (Guo et al. 2004; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Balazadeh et al. 2008; Breeze et al. 2011). Bislang ist nur für einige dieser TFs wie z.B. für die WRKY-TFs

WRKY6 (Robatzek und Somssich 2001; Robatzek und Somssich 2002), WRKY53 (Hinderhofer und Zentgraf 2001; Miao et al. 2004), WRKY54 oder WRKY70 (Besseau et al. 2012; Ulker et al. 2007) eine Funktion innerhalb von Seneszenzprozessen gezeigt. Insbesondere für WRKY53 konnte eine zentrale Rolle als positiver Regulator in frühen Stadien der Blattseneszenz nachgewiesen werden. So zeigten Mutantanalysen, dass ein Verlust dieses Faktors in einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz resultiert, wohingegen die Überexpression von WRKY53 eine Beschleunigung der Seneszenz zur Folge hat. Zudem wurden mehr als 60 mögliche Zielgene dieses regulatorischen Faktors identifiziert, zu denen eine Reihe von bekannten SAGs sowie weitere TFs zählen (Miao et al. 2004). Neben den WRKY-TFs konnte auch für einige NAC-TFs wie z.B. AtNAP / ANAC029 (Guo und Gan 2006), ORE1 (ORESARA 1) / ANAC092 oder JUB1 (JUNGBRUNNEN 1) / ANAC042 (Wu et al. 2012) eine Bedeutung als tatsächliche Regulatoren von Seneszenzprozessen gezeigt werden. Darüber hinaus wurde in jüngeren Untersuchungen für einige TFs anderer Familien ebenfalls eine Bedeutung für Seneszenzprozesse nachgewiesen. So führte z.B. die konstitutive Überexpression des TFs RAV1 (*Related to ABI3/VP1*) zu einem beschleunigten Seneszenzphänotyp (Woo et al. 2010). Des Weiteren konnte für den R-R-type MYB-like TF AtMYBL ein positiver Effekt auf die Regulation der Seneszenz gezeigt werden (Zhang et al. 2011). Erst kürzlich wurde zudem ein Vertreter der MYB-TF-Familie (MYBR1 / MYB44) durch Jaradat et al. (2013) als ein negativer Regulator der Seneszenz identifiziert. Bislang gibt es dennoch erst wenige Einblicke in die genauen Funktionen von seneszenzassoziierten TFs. Auch über die Regulation der Genexpression dieser Faktoren selbst ist bislang wenig bekannt. Die meisten Informationen konnten dazu bislang für WRKY53 erlangt werden. So identifizierten Miao et al. (2007) eine Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase (MEKK1) als ein WRKY53-DNA-Bindeprotein, das zudem in der Lage ist, WRKY53 selbst zu binden. Dabei konnten die Autoren weiter zeigen, dass MEKK1 *in vitro* WRKY53 phosphorylieren und so die DNA-Bindeaffinität des TFs beeinflussen kann. Gleichzeitig kann WRKY53 über die Interaktion mit der HECT3 Ubiquitin-Ligase UPL5 reguliert werden. So zeigten *in vitro*-Studien, dass die Aktivität des TFs durch UPL5-vermittelte Polyubiquitinierung und anschließender Degradation von WRKY53 reguliert werden kann (Miao und Zentgraf 2010). Zusätzlich konnten Miao und Zentgraf (2007) die Interaktion von WRKY53 mit dem Jasmonat-induzierbaren Protein EPITHIOSPECIFYING SENESCENCE REGULATOR (ESR/ESP) zeigen. Durch *in vitro*-Studien wiesen diese Autoren dabei einen negativen Effekt von ESR auf die DNA-Bindeaffinität von WRKY53 nach. Anhand dieses Beispiels ist davon auszugehen, dass das gesamte Spektrum von Transkription, posttranskriptionellen Prozessen, Translation bis hin zu posttranslationalen Modifikationen sowie der selektiven Proteolyse an der Regulation von seneszenzabhängig regulierten TFs und anderer SAGs beteiligt sein könnte. Neben all diesen Faktoren zeigt eine Vielzahl von Untersuchungen, dass die Chromatinstruktur einen maßgeblichen Einfluss auf die Regulation der Genexpression haben kann (Abb. I-3; Eberharter und Becker 2002; Grunstein

1997). So muss es z.B. für die Aktivierung eines Gens zu lokalen Chromatinveränderungen kommen, um den Zugang von TFs und die Rekrutierung des RNA-Polymerase II-Transkriptionsinitiationskomplexes zu ermöglichen. Zudem gibt es eine Reihe von Prozessen, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, die die Chromatinstruktur hinsichtlich der „Ablesbarkeit“ eines Gens beeinflussen können.

I.4.2 Regulation der Genexpression durch dynamische Veränderungen der Chromatinstruktur.

Die genomische DNA (gDNA) von Eukaryoten liegt im Zellkern dicht verpackt, komplexiert mit einer Vielzahl von Proteinen vor. Etwa die Hälfte dieser Proteine setzt sich aus Histonproteinen zusammen. Die grundlegende Struktur dieses DNA-Proteinkomplexes, der als Chromatin bezeichnet wird, ist das Nukleosom (*core particle*). Es besteht aus einem Histonoktamer, das sich jeweils aus zwei Molekülen der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 (*core histones*) zusammensetzt und von etwa 146 bp DNA ummantelt wird. Dabei bilden jeweils zwei H3/H4-Dimere ein zentrales Histon-Tetramer, das auf jeder Seite von einem H2A/H2B-Dimer flankiert wird (Jing et al. 2005; Jenuwein und Allis 2001). Benachbarte Nukleosomen wiederum sind über einen etwa 20-80 bp großen DNA-Abschnitt, der mit dem sog. Linkerhiston H1 assoziiert vorliegt, miteinander verbunden, wodurch es zu einer weiteren Verdichtung der gDNA kommt (Luger et al. 1997). Die Nukleosomen können durch Interaktion mit anderen Proteinen weitere höhere Verpackungszustände erreichen. So kann das Chromatin in Zellkernen, sich nicht teilender Zellen (Interphasezellkerne) in Abhängigkeit von dem Verpackungsgrad der Nukleosomen entweder „aufgelockert“ oder stark kondensiert vorliegen und wird daher klassischer Weise in die zwei funktionellen Stadien Euchromatin und Heterochromatin eingeteilt. Dabei ist für das weniger kompakte Euchromatin ein höheres Transkriptionspotential charakteristisch, da hier die DNA zugänglich für TFs und chromatinassoziierte Proteine ist. Im Gegensatz dazu ist für das stark kondensierte Heterochromatin eine Blockade notwendiger Zugangsstellen für die Bindung von TFs und der RNA-Pol II-Maschinerie typisch, was in der Regel zu einer Unterdrückung der Transkriptionsaktivität führt (Jenuwein und Allis 2001; Kouzarides 2007). Weiterhin ist die Gendichte euchromatischer Bereiche deutlich höher als im Heterochromatin, das sich wiederum insbesondere aus repetitiven Sequenzen sowie nicht kodierender DNA zusammensetzt (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Das Heterochromatin kann zudem in zwei Subtypen unterteilt werden, das konstitutive und das fakultative Heterochromatin. Konstitutives Heterochromatin ist durch eine hohe Dichte an repetitiven, nicht kodierenden DNA-Elementen gekennzeichnet und findet sich im Genom vor allem in Telomer- oder Zentromerregionen sowie perizentromerischen Regionen. Zudem enthält es nur wenige Gene, die i. d. R. inaktiv sind (Oberdoerffer und Sinclair 2007). Das fakultative Heterochromatin hingegen entsteht z.B. durch die transkriptionelle Inaktivierung aktiver Gene innerhalb von Entwicklungsprozessen oder in

Antwort auf externe Stimuli. Die genannten Chromatinzustände sind nicht statisch, sondern flexibel und unterliegen dynamischen Veränderungen, die in Folge verschiedener endogener und exogener Stimuli umgesetzt werden können. So zeigt eine Vielzahl von Studien, eine Beteiligung übergeordneter lokaler und globaler Chromatinveränderungen an der Kontrolle der Genexpression innerhalb wichtiger pflanzlicher Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse sowie der molekularen Antwort der Pflanze auf Umwelteinflüsse (Berger und Gaudin 2003; Wagner 2003; Tessadori et al. 2007; Pecinka und Mittelsten Scheid 2012). Zu den Mechanismen, die die Veränderungen der Chromatinstruktur umsetzen, gehören die Methylierung von gDNA (Gehring und Henikoff 2007; Zilberman et al. 2007), die Wirkungen nicht kodierender RNAs (*non coding RNAs*; ncRNAs) (Zhou et al. 2010a), kovalente Histonmodifikationen (Kouzarides 2007) einschließlich dem Austausch von Histonvarianten (Zlatanova und Thakar 2008; Wollmann et al. 2012) sowie ATP-abhängiges Chromatinremodeling (Jerzmanowski 2007). Dabei sind die verschiedenen Wege oft voneinander abhängig und interagieren in einem komplexen Netzwerk miteinander (Tariq und Paszkowski 2004; Henderson und Jacobsen 2007; Saze et al. 2012). Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Mechanismen, die die Expression von Genen durch Veränderungen der Chromatinstruktur regulieren, gehören die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen. Diese Mechanismen werden im Folgenden näher erläutert.

I.4.2.1 DNA-Methylierung und Demethylierung.

Die DNA-Methylierung ist eine der am besten untersuchten chemischen Modifikationen des Chromatins und basiert auf dem Anfügen einer Methylgruppe an Nukleotide, zumeist an Cytosin (Richards 1997; Klose und Bird 2006; Law und Jacobsen 2010). Dabei wird während der Katalyse durch Methyltransferasen die Methylgruppe, die von dem Donormolekül S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) stammt, auf das fünfte Kohlenstoffatom der Cytosinbase transferiert (Abbildung I-4). Während sich in Säugern die Methylierung von Cytosinen zumeist auf CG-Dinukleotide [CpG] beschränkt (He et al. 2011), findet man in Pflanzen Methylierungen von Cytosinen in allen möglichen Kontexten [symmetrisch: CpG und CpHpG sowie asymmetrisch: CpHpH; (H = A, C oder T)] (Lister et al. 2008; Cokus et al. 2008; He et al. 2011). Genomweite Methylomanalysen in *Arabidopsis* ergaben eine Methylierungsrate von 24%, 6,7% und 1,7% für die entsprechenden CpG, CpHpG und CpHpH-Motive (Cokus et al. 2008). Zudem konnten Lister et al. (2008) zeigen, dass die relative Verteilung von methylierten Cytosinen (5mC) zwischen den verschiedenen Motiven bei 55% für CpG, 23% für CpHpG und 22% für CpHpH lag. Demnach machen fast die Hälfte der methylierten Cytosine solche der nicht CpG-Motive aus. Weiterhin fanden beide Studien heraus, dass alle drei Formen der Methylierungen insbesondere in den *Repeat*-reichen Regionen des Perizentromers sowie an Transposons und Pseudogenen vorkommen, wohingegen an Genen in der Regel vor allem, jedoch nicht ausschließlich Methylierungen des CpG-Motivs gefunden wurden.

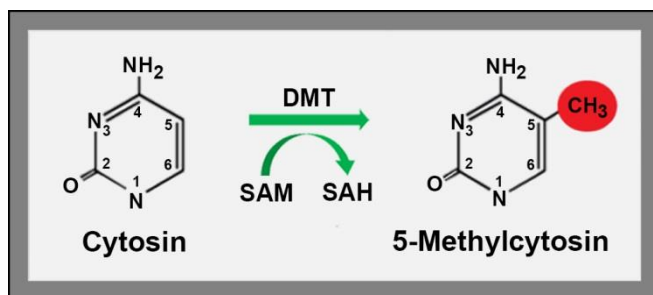


Abbildung I-4: Cytosinmethylierungsreaktion. Die Methylierung an der C5-Position des Cytosinringes zu 5-Methylcytosin wird durch DNA-Methyltransferasen (DMTs) vermittelt. Dabei dient das Molekül SAM als Methyl donor. SAM, S-Adenosyl-L-Methionin; SAH, S-Adenosyl-Homocystein.

Die Methylierung der DNA wird durch das hochselektive Wirken von DNA-Methyltransferasen sowie DNA-Demethylierenden Enzymen reguliert. Korrespondierend zu den in Pflanzen möglichen drei verschiedenen Sequenzkontexten der Cytosinmethylierung, existieren drei funktionelle Klassen von DNA-Methyltransferasen, die innerhalb der *de novo*-Bildung und/oder der Aufrechterhaltung der Methylierung an CpG, CpHpG und CpHpH-Motiven beteiligt sind. Neuere Studien zeigen zudem, dass die verschiedenen Wege der Cytosinspezifischen DNA-Methylierung miteinander interagieren (Stroud et al. 2013). DNA-Methylierung an Cytosinen wird in Pflanzen auf drei verschiedenen Wegen aufrechterhalten. So ist die METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), das orthologe Enzym zu DNMT1 aus Säugern, für das Bestehen der Methylierung an CpG-Motiven verantwortlich (Law und Jacobsen 2010), wohingegen die Methylierung von CpHpG Motiven vorrangig durch die pflanzenspezifische Methyltransferase CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) vermittelt wird (Law und Jacobsen 2010; Feng et al. 2010). Die Generierung der asymmetrischen CpHpH-Methylierung erfolgt durch die Methyltransferasen DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE2 (DRM2), einem Orthologen der Methyltransferase DNMT3 aus Säugern sowie CMT2 (Stroud et al. 2014; Zemach et al. 2013). Die Katalyse der *de novo*-Methylierung aller drei Cytosinsequenzkontexte erfolgt zudem durch die *de novo*-Methyltransferase DRM2 (Cao und Jacobsen 2002a, 2002b) und agiert in Zusammenarbeit mit dem sog. *RNA-directed DNA methylation* (RdDM) Weg, der die Wirkung von ncRNAs inkludiert (Law und Jacobsen 2010; Böhmendorfer et al. 2014). Für einen korrekten Ablauf der DNA-Methylierungsprozesse sind allerdings neben diesen essentiellen Methyltransferasen viele andere Faktoren wie die Chromatinremodeling ATPasen DDM1 (Jeddeloh et al. 1999; Zemach et al. 2013) und DRD1 (Kanno et al. 2005), Methylcytosinbindeproteine wie VIM1, 2 und 3 (Woo et al. 2008) oder auch Histonmethyltransferasen wie SUVH4 oder SUVH5 (Ebbs und Bender 2006; Jackson et al. 2002) notwendig.

Die Methylierung von Cytosinen ist wie erwähnt nicht unumkehrbar, sondern reversibel und kann sowohl passiv als auch aktiv, durch sog. DNA-Glykosylasen wie DEMETER (DME), DEMETER-LIKE 2 und 3 (DML2 und DML3) oder REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) durch die Trennung glykosidischer Bindungen aus der DNA-Sequenz entfernt werden (Choi et al. 2002; Gehring et al. 2006; Agius et al. 2006; Penterman et al. 2007; Ortega-Galisteo et al. 2008). In Pflanzen werden der DNA-Methylierung vor allem zwei wichtige Funktionen zugeordnet. Zum einen sichert eine korrekte DNA-Methylierung die Genomintegrität durch das *Silencing*

„eigennütziger DNA“ (Retrotransposons und DNA-Transposons) und Repeatsequenzen wie zentromerischen *Repeats* (Chan et al. 2005). Zum anderen kann die Methylierung von Promotor- und Genregionen Einfluss auf die Expression von Genen nehmen (Bird 2002; Zhang et al. 2006; Zilberman et al. 2007). In der Regel korreliert dabei eine hohe Methylierungsrate an Promotoren mit einem *Silencing*, also einer Unterdrückung der Expression des jeweilig nachgeschalteten Gens. Für eine Vielzahl von Eukaryoten konnte in genomweiten Untersuchungen gezeigt werden, dass nicht nur repetitive Sequenzen, Transposons sowie einige Promotoren, sondern auch kodierende Bereiche von Genen methyliert vorliegen können (Suzuki und Bird 2008). So konnte z.B. für *Arabidopsis* festgestellt werden, dass etwa ein Drittel aller Gene in ihren kodierenden Bereichen methyliert vorliegt (Zhang et al. 2006; Zilberman et al. 2007). Im Gegensatz zur Methylierung von Promotoren, bedingt die Methylierung in kodierenden Bereichen von Genen (*body methylation*) jedoch nicht zwangsläufig eine Repression der Expression (Cokus et al. 2008; Zhang et al. 2006; Zilberman et al. 2007). Die genaue biologische Bedeutung der „*body methylation*“ ist bislang noch nicht eindeutig aufgeklärt.

Um die Wirkung der DNA-Methylierung auf die Expression von Genen zu verstehen, ist es essentiell aufzuklären wie die Signale der DNA-Methylierung erkannt, weitergeleitet und interpretiert werden. Dabei wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt (zusammengefasst in Joulie et al. 2010). So ist ein möglicher Mechanismus, dass die Methylierung zu Veränderungen der Chromatinstruktur führt. Daraus resultierende Änderungen der Nukleosomenpositionen können dann die Zugänglichkeit der DNA für Regulatoren der Transkriptionsmaschinerie beeinflussen (Segal und Widom 2009). Eine weitere Möglichkeit wäre eine sterische Blockade der direkten Bindung von TFs an die DNA, die so zu einer Repression des nachgeschalteten Gens führen könnte (Campanero et al. 2000; Inamdar et al. 1991; Scebba et al. 2003). Ein dritter Weg für die Erkennung und Interpretation von DNA-Methylierung kann die Bindung von Methylcytosin (5mC)-bindenden Proteinen und die folgende Ausbildung eines veränderten Chromatinzustandes sein (Clouaire und Stancheva 2008; Zemach und Grafi 2007). Sowohl in Tieren als auch in Pflanzen ist eine Anzahl solcher 5mC-bindenden Faktoren bekannt. Zu diesen Proteinen gehören die sog. MBD-Proteine (Methyl-Bindedomäne Proteine). In *Arabidopsis* z.B. hat man bislang 13 Gene, die für MBDs kodieren, identifiziert (Zemach und Grafi 2007). Für mindestens drei dieser putativen MBD-Proteine (AtMBD5, AtMBD6 und AtMBD7) konnte bislang zumindest *in vitro* eine Bindung an CpG-Motive, im Fall von AtMBD5 zudem auch an CpHpH-Motive, in Abhängigkeit von ihrem Methylierungszustand nachgewiesen werden (Ito et al. 2003; Zemach und Grafi 2003; Scebba et al. 2003). Eine zweite Klasse von Faktoren, die methylierte Cytosine erkennen können, sind Proteine mit einer sog. SRA-Domäne (*SET- and RING-finger associated*) wie die VIM- („VARIANT IN METHYLATION 1“) oder SUVH- (SU(VAR)3-9 HOMOLOG) Proteine. Für einige Vertreter dieser Proteinfamilien wie VIM1 oder SUVH2, SUVH4, SUVH6 oder SUVH9 konnte ebenfalls *in vitro* eine Bindung von 5mCs gezeigt werden (Woo et al. 2008;

Johnson et al. 2007; Johnson et al. 2008). Interessanterweise kodieren die SUVH-Proteine für Histonmethyltransferasen und werden daher als Integratoren bei der Translation der DNA-Methylierungssignale auf Histonmethylierungsmuster diskutiert (Johnson et al. 2007). Alles in allem gelten MBPs momentan als die Hauptregulatoren der Übertragung von DNA-Methylierungssignalen auf Histonmodifikationen und letztlich auf die Änderungen der Expression von Genen. Dennoch kann die Wirkung anderer Mechanismen und Mediatoren nicht ausgeschlossen werden.

Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte zeigen, dass Störungen im komplexen System der genomischen DNA-Methylierung starke Entwicklungsstörungen sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Systemen bedingen (Bird 2002; Zhang et al. 2010; Zhang und Jacobsen 2006; Zhang et al. 2010). Der Einfluss der DNA-Methylierung auf pflanzliche Entwicklungsprozesse konnte zuerst durch Finnegan et al. (1996) sowie Cao und Jacobsen (2002a) gezeigt werden. Diese Autoren fanden heraus, dass *Arabidopsis loss-of-function* Transgene der Methyltransferasen MET1, DRM2 und CMT3 durch eine genomweiten Hypomethylierung und diverse Entwicklungsdefekte gekennzeichnet sind. Auch für andere Pflanzenspezies wie z.B. für Reis (*Oryza sativa*) konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Verlust der orthologen OsDRM2-Methyltransferase zu pleiotropen Störungen von Entwicklungsprozessen führt (Moritoh et al. 2012). Interessanterweise konnten zudem einige Untersuchungen in Angio- und Gymnospermen zeigen, dass es zu Veränderungen der DNA-Methylierung während Reifungs- und Alterungsprozessen kommt (Diaz-Sala et al. 1995; Fraga et al. 2002). Zudem belegen jüngere Studien, dass ein Zusammenhang zwischen der pflanzlichen Stressantwort und der DNA-Methylierung besteht (Pavet et al. 2006; Pecinka et al. 2010; Bilichak et al. 2012; Downen et al. 2012; Karan et al. 2012).

I.4.2.2 Histonmodifikationen.

Histone sind basische Proteine, deren Aminosäurezusammensetzung, bis auf die des „Linkerhistons“ H1, zwischen tierischen und pflanzlichen Spezies stark konserviert ist. Sie bestehen aus einer globulären Domäne sowie einem flexiblen NH₂-Terminus, der aus dem Verband des Nukleosoms herausragt. Eine besondere Eigenschaft der Histone ist ihr Potential reversibel, durch kovalente posttranslationale Modifikationen, vielfältig modifiziert zu werden. So kann eine Reihe von Aminosäuren, insbesondere in den Bereichen des NH₂-Terminus, u. a. durch Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung oder Sumoylierung variiert werden (zusammengefasst in Kouzarides 2007). Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigte, dass diese kovalenten Modifikationen spezifischer Aminosäuren auf die Expression von Genen Einfluss nehmen können. Neben der Funktion bei der Verpackung der gDNA, ist dies eine weitere wichtige Funktion von Histonproteinen. Es gibt zwei Hypothesen über die möglichen Wirkungen der Histonmodifikationen auf die Regulation der Genexpression. Die sog. Ladungs-Hypothese beruht

darauf, dass Histonmodifikationen die Chromatinstruktur durch Veränderungen der Ladung der basischen Histone direkt beeinflussen, und so die Assoziation an die negativ geladene DNA verändern, was wiederum den Packungsgrad des Chromatins oder auch die Zugänglichkeit für Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) regulieren könnte (Berger 2002). Nach der sog. „Histoncode-Hypothese“ (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001) können transkriptionsinaktive- oder aktive Chromatinzustände in Abhängigkeit von der Art der Modifikation, der modifizierten Aminosäure selbst sowie dem gesamten Modifikationsmuster eines Histons etabliert werden. So korreliert z.B. die Acetylierung von Lysin im Allgemeinen mit einem transkriptionsaktiven Zustand (Kouzarides 2007). Im Gegensatz zur Acetylierung, können Methylierungen in Abhängigkeit von der methylierten Aminosäure sowie der Anzahl der angehängten Methylgruppen entweder einen aktiven oder einen repressiven Zustand des Chromatins bedingen (zusammengefasst in Liu et al. 2010). Dabei ist eine Mono-, Di- oder sogar Trimethylierung von Aminosäuren möglich. Mit aktiven Genen assoziiert findet man in Pflanzen z.B. an den Lysinresten 4 und 36 trimethyliertes H3-Histon (H3K4me3, H3K36me3). Auf der anderen Seite sind die Mono- und Dimethylierung von Histon H3 an den Lysinresten 9 und 27 zumeist in transkriptionsinaktiven heterochromatischen DNA-Bereichen lokalisiert (Zhou et al. 2010b; Lachner et al. 2003; Zhang et al. 2009). Im Gegensatz zum DNA-Code scheint der Histoncode nicht universell zu sein. So existieren artspezifische Unterschiede in der Korrelation einiger Histonmodifikationen mit transkriptionsinaktivem und aktivem Chromatin (Loidl 2004; Ha et al. 2011). Zum Beispiel ist die Trimethylierung von Histon H3 an der Position Lysin 9 (H3K9me3) in *Drosophila (Drosophila melanogaster)* eine spezifische Histonmethylierung für repressives Chromatin (Ebert et al. 2004). Im Gegensatz dazu findet man diese Modifikation in *Arabidopsis* im Euchromatin (Naumann et al. 2005). Für *Arabidopsis* ist exemplarisch eine Auswahl posttranslationaler Modifikationen an Histon H3 und H4 in Abbildung I-5 dargestellt. Dabei werden Histonmodifikationen unterschieden, für die ein Zusammenhang entweder mit transkriptionskompetentem (Abb. I-5A) bzw. transkriptionsinaktivem (repressivem) Chromatin (Abb. I-5B) beschrieben worden ist. Eine weitere Annahme der Histoncode-Hypothese ist, dass die verschiedenen Modifikationen kombinatorisch auf die Genexpression einwirken. Die unterschiedlichen Modifikationen können demnach synergistische oder antagonistische Effekte auf die Bindung chromatinassoziierter Proteine haben. Dabei ist die Zusammensetzung der Modifikationen für den Wechsel zwischen offenem und repressivem Zustand des Chromatins von entscheidender Bedeutung. So entsteht eine große Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten modifizierter Histone für die Feinregulierung der Genexpression und somit die Grundlage zur Errichtung zeitlich und räumlich differenzierter Chromatinbereiche. Die Histoncode-Hypothese beinhaltet weiterhin, dass bestimmte Histonmodifikationen die Zugänglichkeit von Bindestellen an den Nukleosomen für spezifische Proteine (sog. *Effector* oder *Reader* Proteine), die entweder als Aktivatoren oder Repressoren wirken können, verändern und so Einfluß auf die Genregulation

nehmen (Jenuwein und Allis 2001). In Abhängigkeit von der Art der posttranslationalen Modifikation sind solche Histon-Code interpretierenden Faktoren, Proteine mit bestimmten Domänen, die die Erkennung der spezifischen Modifikation ermöglichen (zusammengefasst in Taverna et al. 2007). So können bestimmte Proteine, die z.B. eine Chromodomäne oder PHD-Domäne tragen, spezifisch die Methylierung bestimmter Lysine an H3 oder H4 detektieren.

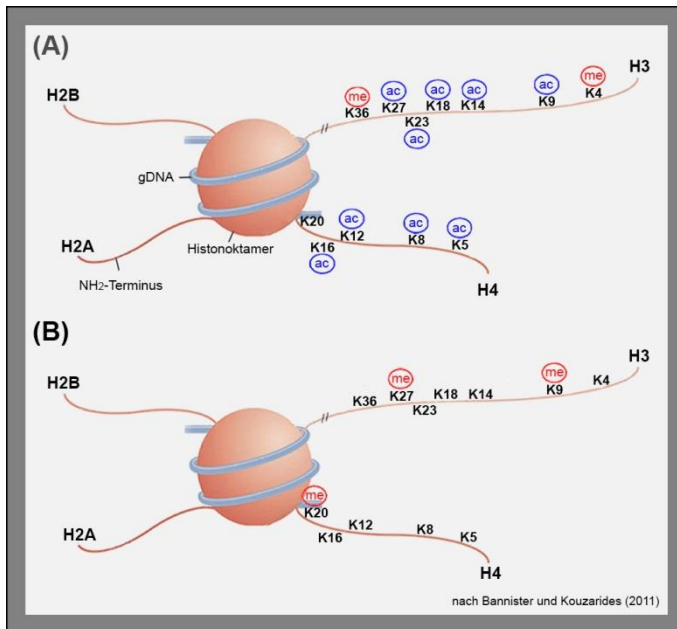


Abbildung I-5: Posttranslationale Histonmodifikationen an den NH₂-Termini von Histonen, exemplarisch für H3 und H4. Dargestellt sind jeweils ein Nucleosom (ohne Linker-DNA und Histon H1), bestehend aus einem Histonoktamer, die flexiblen NH₂-Termini der Histone (je nur ein Ende pro Histon gezeigt) sowie die assoziierte gDNA. Zusätzlich sind für die N-terminalen Enden von H3 und H4 exemplarisch Modifikationen (Methylierung und Acetylierung) gezeigt, die in Arabidopsis mit aktivem Chromatin assoziiert vorliegen (A) bzw. die in Arabidopsis mit repressivem Chromatin assoziiert vorliegen (B). K, Lys; S, Ser; me, Methylierung; ac, Acetylierung; ph, Phosphorylierung [modifiziert nach Bannister und Kouzarides (2011), Charron et al. (2009) sowie Pfluger und Wagner (2007)].

Wie erwähnt, sind die posttranslationalen Modifikationen nicht zwangsläufig stabil, sondern reversibel und können sehr dynamischen Veränderungen unterliegen. Diese Änderungen erfordern einerseits die Wirkung von Enzymen, die die Modifikationen anfügen (sog. *Writer*-Proteine) und andererseits Faktoren, die die entsprechend angefügten Modifikationen auch wieder entfernen können (sog. *Eraser*-Proteine). Bis heute hat man 13 verschiedenen Gruppen solcher Enzyme wie Histonacetyltransferasen (HATs), Histondeacetylasen (HDAs), Histonmethyltransferasen (HMTs: Lysin = HMTs oder Arginin = HKMTs) oder Histonmethylasen (HDMs) identifiziert (Tan et al. 2011; Zhou et al. 2011; Thorstensen et al. 2011; Lauria und Rossi 2011; Seto und Yoshida 2014). Zu den am besten untersuchtesten histonmodifizierenden Enzymklassen zählen die sog. Lysin-Histonmethyltransferasen.

I.4.2.2.1 Lysinmethylierung und Demethylierung von Histonen in Pflanzen.

Lysin-Histonmethyltransferasen sind HMTs, die die Übertragung von ein bis drei Methylresten auf Lysine an Histonen katalysieren. Im Vergleich zu Histonacetyltransferasen ist ihre Affinität oft sehr spezifisch und auf ein einziges Lysin an einem bestimmten Histon beschränkt. Das Anfügen einer oder mehrerer Methylierungen kann dabei die Transkription positiv (H3K4, H3K36) oder negativ (H3K9, H3K27, H4K20) beeinflussen (zusammengefasst in Kouzarides 2007; s. z. T. auch in Abb. I-5). Das katalytische Zentrum der HMTs ist zumeist die sog. SET-Domäne (Rea et al. 2000). Diese konservierte Domäne wurde zuerst in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) in den drei verschiedenen Proteinen SU(VAR)3-9, ENHANCER OF ZESTE [E(Z)H] sowie

TRITHORAX (TRX) gefunden (Tschiersch et al. 1994; Jenuwein et al. 1998) und verdankt diesen ihren Namen. SU(VAR)3-9 (SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9) ist eines der ersten und bekanntesten SET-Domänenproteine. *SU(VAR)3-9* wurde in *Drosophila* als dosisabhängiger Suppressor für PEV (Positionseffekt-Variation; Reuter und Spierer 1992; Tschiersch et al. 1994) gefunden und kodiert für eine Histonmethyltransferase, die spezifisch Histon H3 an der Position Lysin 9 (H3K9) methyliert (Schotta et al. 2002). Die Suche nach orthologen Proteinen in *Arabidopsis* ergab 29 Gene, die für SET-Domänenproteine kodieren (Baumbusch et al. 2001). Sie können in Abhängigkeit von ihren korrespondierenden Proteinen in *Drosophila* in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden: E(Z), TRX, ASH1 (ABSENT, SMALL or HOMEOTIC Discs1; Tripoulas et al. 1996) und SU(VAR)3-9 (Baumbusch et al. 2001; Thorstensen et al. 2011). Die größte Gruppe dieser SET-Domänenproteine, die zudem durch eine C-terminale pre-SET-Domäne gekennzeichnet sind, stellen die SU(VAR)3-9 orthologen Proteine dar, die wiederum in Abhängigkeit vom Auftreten einer zusätzlichen YDG/SRA-Domäne (YDG / *Set and Ring Associated protein domain*) in zwei Gruppen unterteilt werden können. Zehn der 15 SU(VAR)3-9 orthologen Proteine (SUVH1-10) enthalten eine solche Domäne und werden als SUVHs (SU(VAR)3-9 HOMOLOG) bezeichnet (Abbildung I-6). Für die SRA-Domäne konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie für die Erkennung von 5mC verantwortlich ist (Rajakumara et al. 2011). So konnte wie in Kapitel IV.4.2.1 erwähnt, für einige der SUVH-Proteine wie z.B. SUVH2, SUVH5 oder SUVH9 bereits eine Bindung von methylierter DNA gezeigt werden (Johnson et al. 2007; Johnson et al. 2008; Rajakumara et al. 2011). Demnach scheint die Rekrutierung von SUVH-Proteinen durch methylierte DNA sowie das Anfügen von Histonmethylierungen an die rekrutierten Zielloci ein SRA-Domänen-vermittelter Mechanismus zu sein. Für die repressive H3K9-Methylierung wiederum konnte die Bindung der Methyltransferase CMT3 gezeigt werden, was zu einer Art selbstverstärkenden Schleife in der Ausbildung repressiver Chromatinmodifikationen führen könnte (Johnson et al. 2007). SUVH2 und SUVH9 bilden eine Subgruppe der SUVH-Proteine (Abbildung I-6). Ihnen fehlt die katalytisch wichtige post-SET-Domäne (Rea et al. 2000). Analog dazu, gelang es bislang nicht eindeutig nachzuweisen, ob die beiden SUVH-Proteine tatsächlich eine HMT-Aktivität besitzen, wie sie *in vitro* z.B. für SUVH4 (KYP, KRYPTONITE), SUVH5 oder SUVH6 (Jackson et al. 2004; Ebbs und Bender 2006) gezeigt werden konnte. *In vitro* Untersuchungen zu der HMT-Aktivität von SUVH2 ergaben kontroverse Ergebnisse (Naumann et al. 2005; Johnson et al. 2008). Es ist möglich, dass SUVH2 und SUVH9 selbst keine HMT-Aktivität *in vivo* besitzen, wohl aber wichtige Faktoren für das transkriptionelle Gensilencing sowie die Aufrechterhaltung repressiver Histonmethylierungen sind (Johnson et al. 2008; Kuhlmann und Mette 2012). Den verbliebenen fünf SU(VAR)3-9 orthologen Proteinen, fehlt die SRA-Domäne und sie werden daher in der Untergruppe der SUVRs [SU(VAR)3-9 RELATED; SUV1-5] zusammengefasst (Baumbusch et al. 2001).

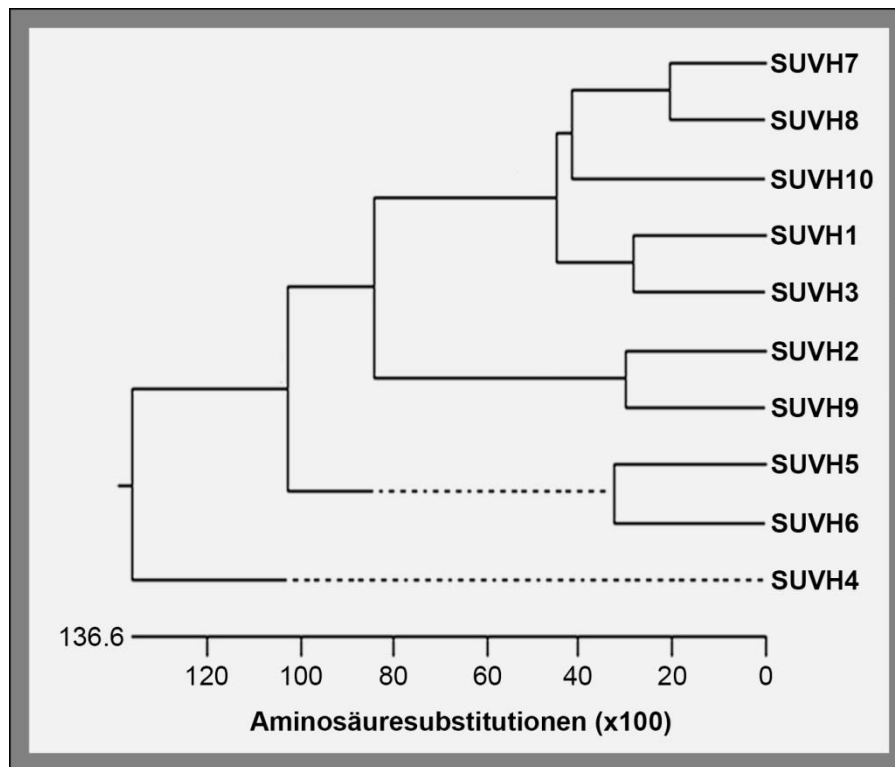


Abbildung I-6: Phylogenetischer Baum der SUVH-Gene in Arabidopsis. Das *multiple sequence alignment* erfolgte basierend auf der Aminosäuresequenzen von SUVH1-10 unter Verwendung des ClustalW Algorithmus mit der BioEdit v7.2.5 Software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA).

Auch die Methylierung von Histonen ist durch sog. *Eraser-* oder *Editor-*Faktoren umkehrbar. Als erste Histondemethylase (HDM) konnte LSD1 (LYSINE-SPECIFIC HISTONE DEMETHYLASE 1) identifiziert werden (Shi et al. 2004). Interessanterweise führt der *knockdown* des LSD1-Orthologen des Wurmes *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne (McColl et al. 2008). Die zweite und größte Gruppe von Lysin-Histondemethylasen sind Enzyme, die eine Jumonji C- (JmjC) Domäne enthalten (Tsukada et al. 2006; Yamane et al. 2006). Im Gegensatz zu LSD1, die nur mono- und dimethylierte Lysine modifizieren kann, sind die JmjC-Domänen-enthaltenden Histondemethylasen (JHDMs) in der Lage, alle drei möglichen Lysinmethylierungszustände zu entfernen. Als erster Vertreter dieser Proteinfamilie konnte JHDM1 identifiziert werden (Tsukada et al. 2006).

I.5 Kontrolle der Seneszenz durch Veränderungen der Chromatinstruktur - eine Arbeitshypothese.

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass es in Antwort auf exogene Stimuli sowie innerhalb komplexer Entwicklungsprogramme zu dynamischen Reorganisationsprozessen der globalen und lokalen Chromatinstruktur kommt (Zhang et al. 2010; Jarillo et al. 2009; Kalamajka et al. 2003; He et al. 2004; Wagner 2003; Hoekenga et al. 2000; Berger und Gaudin 2003). Die Seneszenz als ein wichtiger Schritt in der Entwicklung eines Blattes beinhaltet bzw. wird umgesetzt durch massive Veränderungen der Genexpression, wie sie auch bei anderen Entwicklungsprozessen wie z.B. der Ausbildung der Blüte passieren (s. auch Kapitel I.3.1.1; sowie Abbildung I-7). Wie alle

Entwicklungsprozesse in Pflanzen, handelt es sich auch bei der Seneszenz um einen vielschichtigen, flexiblen und durch exogene wie endogene Stimuli kontrollierbaren Prozess.

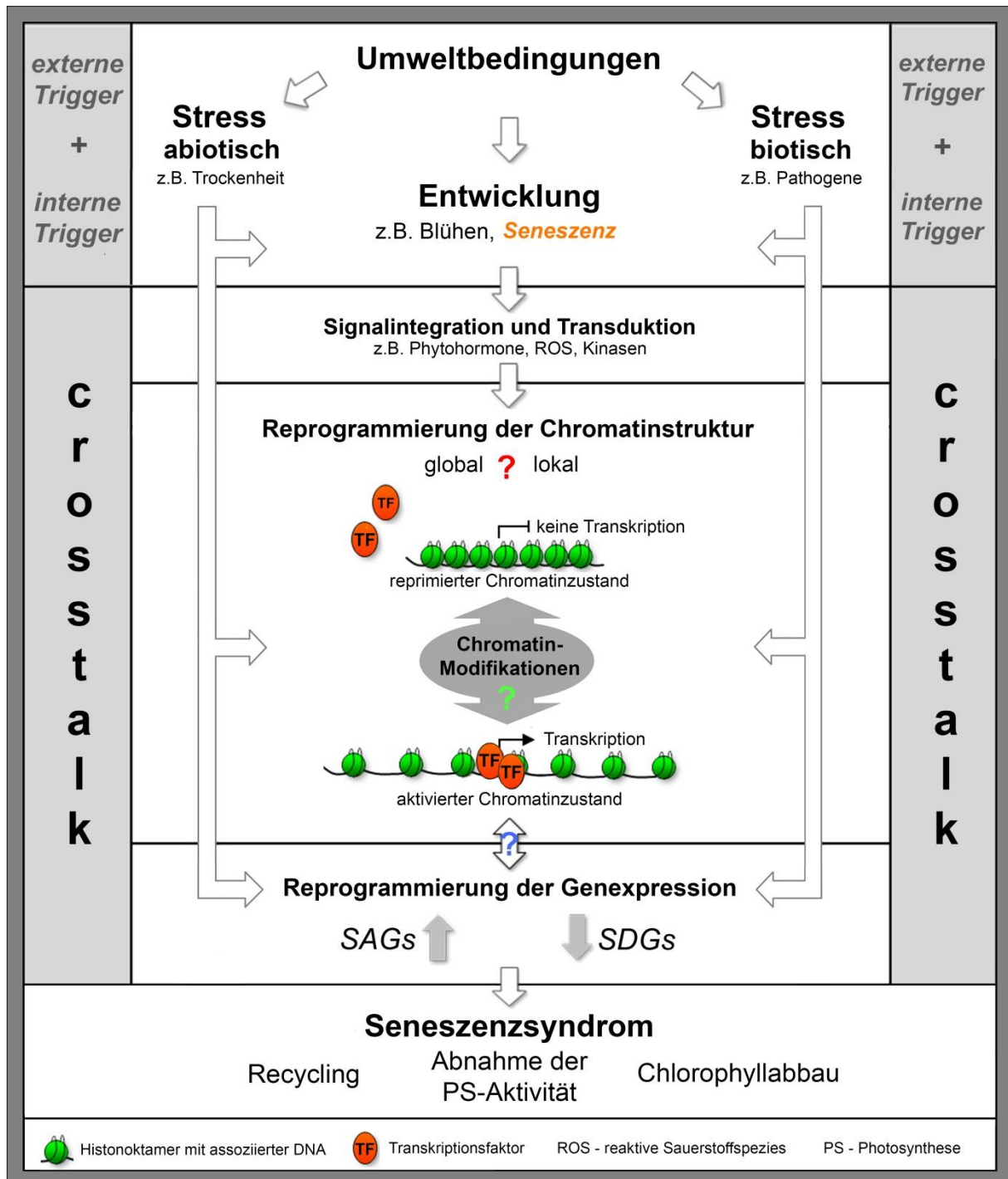


Abbildung I-7: Hypothese: Chromatinveränderungen sind an der komplexen Kontrolle der Genregulation von SAGs und SDGs beteiligt. Die Seneszenz ist ein komplexes und flexibles Entwicklungsprogramm, das durch exogene und endogene Stimuli kontrolliert wird. Es stellt sich für diese Dissertation die übergeordnete Frage, ob es zu globalen und/oder lokalen Veränderungen der Chromatinstruktur in seneszierenden Zellen kommt (rotes Fragezeichen). Wenn ja, könnte untersucht werden, wie genau diese Veränderungen aussehen und welche Faktoren an der Umsetzung und der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind (grünes Fragezeichen). Zudem könnte überprüft werden, ob die Chromatinstruktur einen regulativen Einfluss auf die Expression von SAGs und SDGs hat (blaues Fragezeichen).

Demnach stellte sich zu Beginn der Untersuchungen für diese Arbeit die übergeordnete Frage, ob es zu Veränderungen der Chromatinlandschaft in seneszierenden Blättern kommt. Wenn ja, wäre es interessant herauszufinden, wie genau diese Veränderungen aussehen und ob sie einen regulativen Einfluss auf die Expression von SAGs haben (Abb. I-7). Zudem könnte untersucht werden, welche

Faktoren an der Umsetzung und der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind. Zu Beginn der Arbeiten an diesem Thema gab es kaum Untersuchungen, die eine Beteiligung der Chromatinstruktur an der Kontrolle der seneszenzspezifischen Genexpression vermuten ließen. Die wenigen Hinweise in seneszierenden Zellen stammen zumeist aus globalen Analysen in tierischen und einigen pflanzlichen Organismen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es zu strukturellen Veränderungen des Chromatins in seneszierenden Zellkernen kommt (Drumm und Nagl 1982; Kolodziejek et al. 2007). Altersabhängige Änderungen der Kernstruktur wie dem Verlust des peripheren Heterochromatins konnte zudem für *C. elegans* nachgewiesen werden (Haithcock et al. 2005). So gilt der Zusammenbruch der Kernstruktur in tierischen Zellkernen als ein charakteristisches Kennzeichen alternder Zellen. Weiterhin konnte für tierische Systeme eine Bedeutung der Histondeacetylierung innerhalb von Altersprozessen nachgewiesen werden (Tissenbaum und Guarente 2001; Blander und Guarente 2004). Untersuchungen von Tian und Chen (2001) lieferten zudem Hinweise, dass auch in Pflanzen der Histonacetylierungsstatus innerhalb der Seneszenz wichtig ist. Die Autoren generierten transgene Arabidopsislinien, die ein Antisensekonstrukt der Histondeacetylase HD1 exprimierten. Die drastische Verringerung der endogenen AtHD1-Expression resultierte in einer deutlichen Akkumulation acetylierter Histone und verursachte pleiotrope Phänotypen der Entwicklung wie z.B. eine Beschleunigung der Seneszenz, eine veränderte Blattmorphologie, verschiedenen Blühdefekte sowie eine Verzögerung des Blühzeitpunktes.

- II. ZIELSETZUNG -

Das finale Stadium der Blattentwicklung, die Seneszenz, geht mit einer komplexen Regulation der Genexpression einher. In den letzten Jahren konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Expression von Genen während wichtiger Entwicklungsprozesse in Pflanzen einer übergeordneten Kontrolle durch Veränderungen der Chromatinstruktur unterliegt. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertationsschrift, gab es kaum Untersuchungen der Chromatinstruktur seneszierender Zellen in Pflanzen oder gar ihrem möglichen Einfluss auf den Verlauf der Seneszenz. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war es daher aufzuklären, ob es zu Chromatinveränderungen während der Blattseneszenz kommt. Dafür sollten im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) unterschiedliche Ebenen der Chromatinorganisation in Korrelation mit der seneszenzspezifischen Genexpression betrachtet und die folgenden Fragestellungen experimentell überprüft werden:

I. Kommt es während der Blattseneszenz zu globalen Veränderungen der Chromatinstruktur in Arabidopsis? Dazu sollten die Verteilungsmuster bekannter euchromatischer und heterochromatischer Chromatincharakteristika in Zellkernen seneszenten Blätter mit denen reifer Blätter verglichen werden.

II. Sind lokale Chromatinveränderungen an der Regulation der Genexpression während der Blattseneszenz beteiligt? Hierzu sollte der Chromatinstatus bekannter seneszenzassoziierter Markergene (SAGs) während der Seneszenz untersucht werden. Über Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) sollte dazu für eine Auswahl von Histonmodifikationen untersucht werden, ob es zu seneszenzabhängigen Veränderungen an SAGs kommt. Dazu war es zunächst notwendig, die ChIP-Methode für das Arabidopsis-Seneszenzsystem zu etablieren. Weiterhin sollte überprüft werden, ob diese Histonmodifikationsmuster mit der Expression der entsprechenden Gene korrelieren.

III. Welche Faktoren könnten einen Einfluss auf die seneszenzspezifische Chromatinstruktur haben? Dabei sollte eine Analyse des Seneszenzverlaufs transgener *loss-* und *gain-of-function* Pflanzen bekannter chromatinassoziierter Proteine erfolgen, um mögliche Faktoren, die den Verlauf der Blattseneszenz beeinflussen können, zu identifizieren. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob und wie sich eine Veränderung der Aktivität solcher Faktoren auf mögliche seneszenzassozierte Veränderungen der Chromatinstruktur auswirkt.

IV. Welche regulatorischen Komponenten der Blattseneszenz könnten Ziele von Chromatinveränderungen während der Seneszenz darstellen? Unter Nutzung transgener Pflanzen, für die eine Beeinflussung des Seneszenzverlaufs gezeigt werden konnte, sollten vergleichend zu Arabidopsis Wildtyppflanzen Expressionsanalysen seneszenzassoziierter regulatorischer Faktoren erfolgen.

-III. ERGBNISSE -

III.1 Etablierung eines definierten Seneszenzscreeningsystems.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Etablierung eines Seneszenzscreeningsystems unter Verwendung physiologischer Marker, um vergleichbare Stadien der Blattentwicklung von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYHN. (*Arabidopsis*) für die nachfolgenden molekularbiologischen Analysen zu definieren. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde im Langtag unter „umweltnahen“, d.h. den natürlichen Wachstumsverhältnissen von *Arabidopsis* ähnlichen Bedingungen (s. Kapitel V.2.1). Abbildung III-1A zeigt repräsentative *Arabidopsis*blattrosetten, die in einem Zeitraum von ein bis sieben Wochen nach Ausbringung auf Erde fotografisch dokumentiert wurden. Dabei ist zu beachten, dass sich die Kotyledonen sowie die ersten sechs Rosettenblätter (als Blatt eins bis acht in Abb. III-1A gekennzeichnet) entwickelt und voll ausgebildet haben, bevor es zur Blühinduktion kommt. Alle Folgeblätter sind entweder noch im Reifeprozess oder entwickeln sich erst während der Blüte. Da die Rosettenblätter zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgebildet werden, ist auch der Zeitpunkt des Einsetzens von Seneszenzprozessen entsprechend verschoben. Auf Grund dessen beschränkten sich alle folgenden Analysen auf die Blätter fünf bis acht, da diese Blätter in etwa zum gleichen Zeitpunkt gebildet werden und so auch der Zeitpunkt einsetzender Seneszenzprozesse vergleichbar sein sollte.

III.1.1 Physiologische Charakterisierung von definierten Seneszenzstadien.

In Abbildung III-1B sind repräsentativ die ausgewählten Rosettenblätter fünf bis acht gezeigt, die ebenfalls in einem Zeitraum von ein bis sieben Wochen nach Ausbringung auf Erde fotografisch dokumentiert wurden. Nach etwa vier Wochen sind erste Ausbleichungserscheinungen zu beobachten, die vorrangig von den Blattspitzen, also an den ältesten Blattbereichen, beginnen. Im weiteren Verlauf der Blattentwicklung schreitet dieser Prozess fort, bis letztlich das gesamte Blatt eine gelblich-braune Farbe angenommen hat. Dieser Ausbleichungsprozess ist Folge eines sehr wichtigen Teilprozess der Blattseneszenz, den Abbau der Chloroplasten und somit des farbgebenden Chlorophylls. Physiologische Parameter wie der Chlorophyllgehalt und die Photosystem II-Effizienz (PSII-Effizienz), die den Abbau der Chloroplasten widerspiegeln, können genutzt werden, um den Fortlauf von Seneszenzprozessen in Blättern zu dokumentieren. Wie in Abbildung III-1B gezeigt, wurden neben einem nicht seneszenten Kontrollstadium (NS), in dem etwa nach zwei Wochen sowohl der Chlorophyllgehalt als auch die PSII-Effizienz maximale Werte erreicht haben, folgende vier Seneszenzstadien determiniert: Das **S0-Stadium** kennzeichnet eine frühe Phase der Seneszenz und ist durch ein signifikantes Absinken des Chlorophyllgehaltes um ca. 25% im Vergleich zur Kontrolle (NS) bei gleichzeitig noch hohem Niveau der PSII-Effizienz definiert. Dieses Stadium wurde in Abhängigkeit vom biologischen Replikat etwa drei Wochen nach Aussaat erreicht. Das **S1-Stadium** soll die mittlere Phase der Seneszenz repräsentieren. Im Vergleich zur nicht seneszenten Kontrolle (NS) ist hier der Chlorophyllgehalt deutlich verringert

und die PSII-Effizienz signifikant um etwa 10% vermindert. Die analysierten Blätter fünf bis acht erreichten durchschnittlich vier Wochen nach Ausbringung auf Erde diese Phase der Seneszenz. Das **S2-Stadium** soll die späte Phase der Seneszenz kennzeichnen und ist durch einen im Vergleich zur Kontrolle (NS) um 70% bis 80% verringerten Chlorophyllgehalt und eine PSII-Effizienz von nur noch etwa 50% im Vergleich zur Kontrolle charakterisiert. Diese späte Phase der Seneszenz wurde etwa fünf Wochen nach Aussaat erreicht.

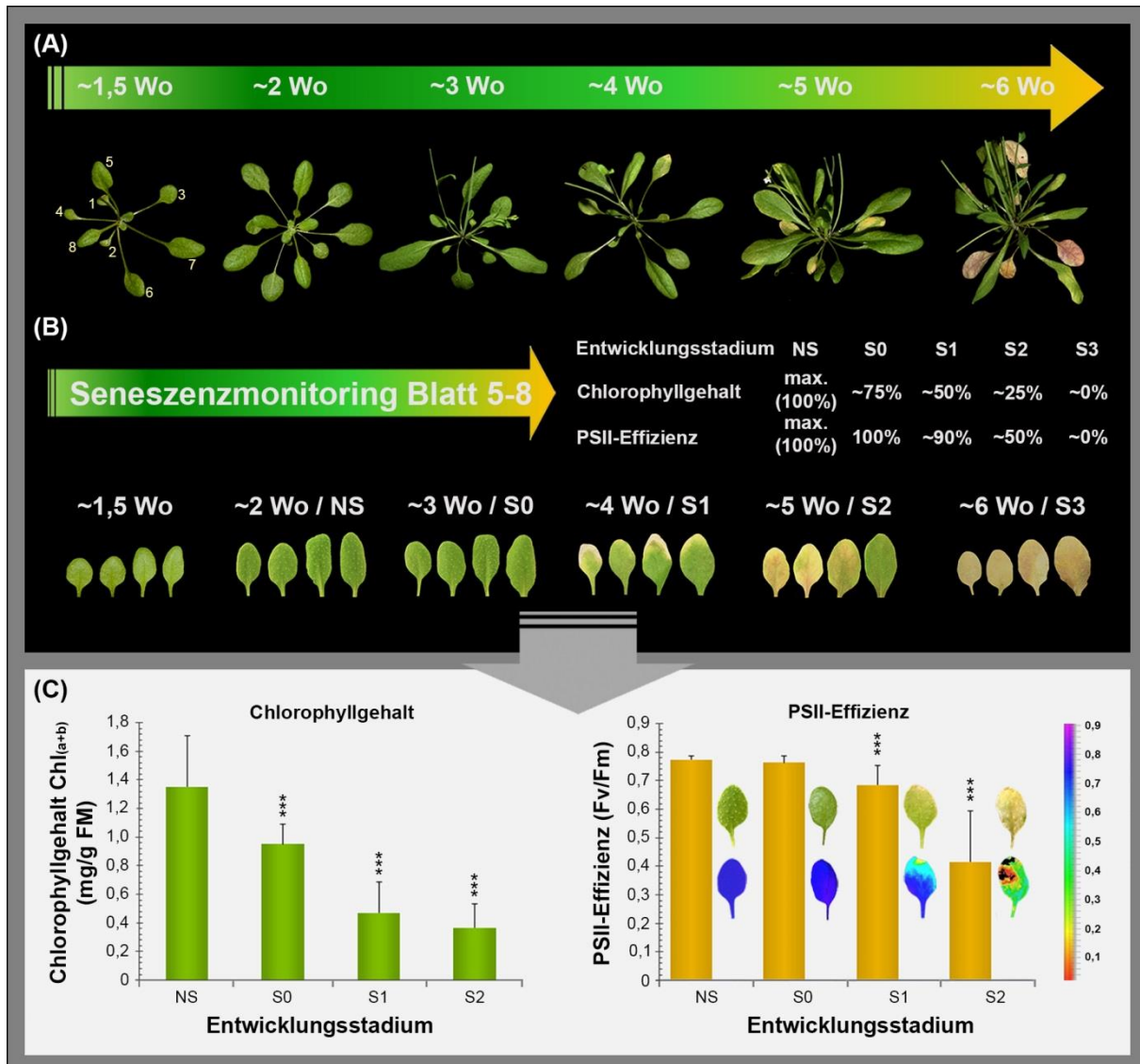


Abbildung III-1: Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung von Entwicklungsstadien. (A) Fotografische Dokumentation der Entwicklung von Arabidopsisrosetten eine bis sieben Wochen (Wo) nach Aussaat. Exemplarisch sind für die erste Pflanze die Kotyledonen mit 1 und 2 sowie die ersten sechs Rosettenblätter nach der Reihenfolge ihrer Ausbildung mit 3 bis 8 nummeriert. (B) Oberer Teil: Tabellarische Auflistung der physiologischen Charakteristika der fünf Entwicklungsstadien, die über die physiologischen Parameter Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz definiert wurden. Unterer Teil: Fotografische Dokumentation der Entwicklung von Blatt 5-8 über die Zeit mit einer Zuordnung der definierten Entwicklungsstadien. (C) Gezeigt sind die Veränderungen des Chlorophyllgehaltes (linke Seite) bzw. der PSII-Effizienz (F_v/F_m = maximale Quantenausbeute von PSII; rechte Seite) in Abhängigkeit von den definierten Seneszenzstadien. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert (mit entsprechender Standardabweichung als dünne Fehlerbalken dargestellt) von je fünf bis zehn Messungen und vier biologischen Replikaten. Zudem sind repräsentative Bilder von Blatt 6 sowie entsprechende Fehlfarbenbilder der Imaging-Pam-Analyse gezeigt. Der entsprechende Maßstab ist am rechten Bildrand zur Orientierung gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede (zweiseitiger Student *t*-Test; sind durch Sternchen markiert (* $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Das hier ebenfalls aufgeführte **S3-Stadium** kennzeichnet in Arabidopsis Wildtyppflanzen abgestorbene Blätter (Blatt 5-8), in denen nur noch minimale Chlorophyllmengen nachgewiesen

werden konnten und bei denen keine PSII-Effizienz mehr messbar war. Dieses Stadium wird wie in Kapitel III.4.2.2.2 beschrieben, für vergleichende Analysen mit transgenen Arabidopsispflanzen, die einen verzögerten Verlauf der Blattseneszenz aufweisen, verwendet. In Abbildung III-1C sind die entsprechenden gemittelten Ergebnisse der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes sowie der PSII-Effizienz für die definierten Stadien aus vier repräsentativen biologischen Replikaten gezeigt. Die Auswahl der definierten Zeitfenster in der Entwicklung der Rosettenblätter vom reifen bis hin zum fortgeschrittenen seneszenten Blatt für die molekularbiologischen Analysen sollte es ermöglichen, die komplexen Abläufe des Seneszenzprogramms zwischen biologischen Replikaten vergleichbarer zu machen.

III.1.2 Molekulare Charakterisierung der definierten Seneszenzstadien.

Aus verschiedenen Untersuchungen ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die während der Blattseneszenz eine gesteigerte oder verminderte Expression aufweisen und daher als sog. **seneszenzassoziierte Gene (SAGs)** oder entsprechend als während der **Seneszenz herunterregulierte Gene (SDGs; *senescence down-regulated genes*)** bezeichnet werden. Um die über physiologische Parameter definierten Entwicklungsstadien (s. Kapitel III.1.1) molekular zu charakterisieren, wurde ein Set von zehn Markergenen ausgewählt und die relativen Transkriptgehalte dieser Gene im Vergleich zum nicht seneszenten Kontrollstadium (NS) mittels quantitativer *realtime* RT-PCR (qRT-PCR) analysiert (Abbildung III-2). Bei acht der zehn Gene (*ANAC019*, *ANAC083*, *WRKY6*, *WRKY53*, *MYB13*, *MYB90*, *SAG12* und *FRK1*) handelt es sich um bekannte SAGs (Buchanan-Wollaston et al. 2005; Miao et al. 2004). Die verbleibenden zwei Gene *RBCS* und *RPS17*, die für die kernkodierte kleine Untereinheit der RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase) bzw. für das ribosomale Protein S17 kodieren, sind bekannte Vertreter der SDGs (Abbildung III-2B). Sechs der acht SAGs kodieren für Transkriptionsfaktoren (TFs), wobei jeweils zwei Vertreter der NAC-, WRKY- und MYB-TF-Familien ausgewählt wurden. Für alle untersuchten SAGs konnte der erwartete Anstieg der Transkriptgehalte gezeigt werden (Abbildung III-2A). Die Expression aller untersuchten TFs, weist jedoch erst im mittleren Seneszenzstadium S1 einen signifikanten Anstieg auf. Im Gegensatz dazu konnte für *SAG12* und *FRK1* sowie die beiden SDGs bereits im S0-Stadium eine signifikante Veränderung der relativen Transkriptmengen festgestellt werden (Abbildung III-2A und B). Insgesamt zeigen die Veränderungen der relativen Transkriptgehalte der untersuchten Markergene, dass die definierten Entwicklungsstadien zur Untersuchung der seneszenzabhängigen Veränderungen auf Chromatinebene geeignet sein sollten.

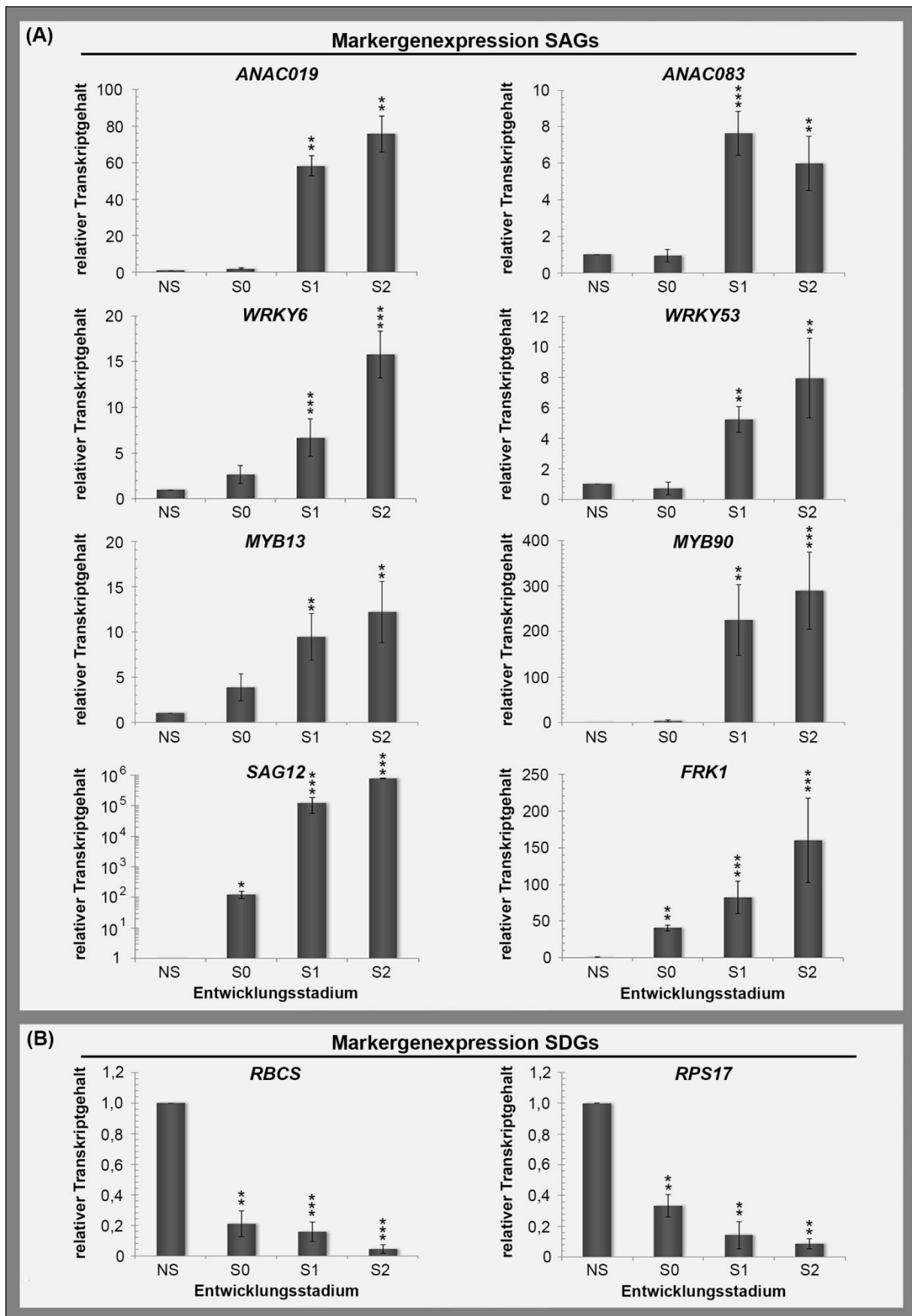


Abbildung III-2: Expression von Seneszenzmarkergenen im definierten Seneszenzsystem. Bestimmung der relativen Transkriptgehalte mittels quantitativer *realtime* RT-PCR (qRT-PCR) in den drei definierten Seneszenzstadien S0, S1 und S2, bezogen auf die Transkriptgehalte in der nicht seneszenten Kontrolle (NS), die gleich eins gesetzt wurden. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der *18S* rRNA anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2). Die Daten zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) sind durch Sternchen markiert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

III.2 Globale Analysen der Chromatinstruktur von Arabidopsis Interphasekernen in ausgewählten Entwicklungsstadien.

Der Zellkern von Eukaryoten, einschließlich der in der Arbeit untersuchten Modellpflanze Arabidopsis, weist eine komplexe Anordnung von heterochromatischen und euchromatischen Domänen auf (Fransz et al. 2002). Diese beiden Zustände sind je nach Spezies durch typische Chromatinmodifikationsmuster gekennzeichnet. Für Interphasekerne reifer Arabidopsis Blattzellen ist bekannt, dass in perizentromerischem Heterochromatin, das in den Chromozentren vorliegt, typischerweise repressive posttranslationale Histonmodifizierungen wie H3K9me1 und H3K9me2 (Mono- und Dimethylierung von Lysin (Lys) 9 an Histon 3), H3K27me1 und H3K27me2 sowie H4K20me1 lokalisiert sind (Fransz et al. 2002; Jasencakova et al. 2003; Jackson et al. 2004; Naumann et al. 2005). Im Gegensatz dazu weisen euchromatische Chromatinbereiche eine typische Häufung anderer Histonmodifikationen wie z.B. die Methylierungen von H3K4 oder die Acetylierung von H3K9 (H3K9ac) auf, die zumeist mit transkriptionskompetentem bzw. transkriptionsaktivem Chromatin korreliert vorliegen (Fuchs et al. 2006; Jasencakova et al. 2003; Zhou et al. 2010c). Zusätzlich sind jedoch auch repressive, also die Transkription inhibierende Histonmodifizierungen wie H3K27me3 (Trimethylierung von Lys27 an Histon 3) in euchromatischen Chromatindomänen zu finden (Zhang et al. 2007; Mathieu et al. 2005). Um die globale Struktur des Chromatins in ausdifferenzierten Blattgeweben während der Seneszenz zu untersuchen, sollte die Verteilung verschiedener Histonmodifikationen, die entweder euchromatische oder heterochromatische Regionen kennzeichnen, analysiert werden. Zum einen wurden die Di- und die Trimethylierung von H3K4 (H3K4me2 und H3K4me3) als typische Histonmodifikationen für euchromatische Bereiche untersucht und zum anderen die Dimethylierung von H3K9 (H3K9me2) als typische Markierung für heterochromatische Bereiche analysiert. Weiterhin wurde dieses Set durch die Analyse der repressiven euchromatischen H3K27me3-Modifikation ergänzt. Die Kerne der immunozytologischen Versuche wurden zudem mit dem DNA-Markierungsfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Intensiv fluoreszierende Bereiche kennzeichnen dabei Regionen im Nukleus, die eine besonders starke Verdichtung von DNA aufweisen. So sind die zentromernahen stark kondensierten Bereiche des konstitutiven Heterochromatins der Chromosomen deutlich in Interphasekernen ausdifferenzierter Arabidopsisblätter als Chromozentren sichtbar (Fransz et al. 2002). In diesen Chromozentren sind vor allem zentromere 180bp-DNA-Repeats (*core repeats*) lokalisiert, die von perizentrischem Heterochromatin, das sich wiederum insbesondere aus Transposons und anderen Repeats zusammensetzt, flankiert werden (Maluszynska und Heslop-Harrison 1991; Fransz et al. 1998; Fransz et al. 2000; Nagaki et al. 2003). Entsprechend der Chromosomenzahl von $2n=10$ in diploiden Interphasekernen von Arabidopsis sind demnach bis zu zehn Chromozentren durch die Anfärbung mit DAPI erkennbar. Im Gegensatz dazu weisen die DNA-armen Regionen der Nukleoli kaum eine DAPI-Fluoreszenz auf und stellen sich daher dunkel im Vergleich zum

restlichen Kernchromatin dar. Da sich die stärksten Veränderungen auf Ebene der Expression der Seneszenzmarkergene im S1-Stadium ergaben (s. Kapitel III.1.2), wurden für die nachfolgenden globalen Chromatinuntersuchungen neben dem nicht seneszenten Kontrollstadium NS, das S1-Stadium sowie das S2-Stadium ausgewählt.

III.2.1 Veränderungen der Verteilungsmuster euchromatischer Histonmodifizierungen von Interphasekernen während der Seneszenz.

Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die euchromatischen Histonmethylierungen H3K4me2 und H3K4me3, erfolgte die immunozytologische Analyse der Verteilungsmuster dieser Chromatinmodifikationen im Verlauf der Seneszenz. In Abbildung III-3A sind repräsentative Aufnahmen von Interphasekernen aus nicht seneszenten (NS) Blättern sowie aus seneszenten Blättern der Stadien S1 und S2 gezeigt. Für beide untersuchten Histonmodifikationen ist in Interphasekernen voll entwickelter Blätter (NS) eine uniforme Verteilung über den gesamten Zellkern erkennbar. Nur der Nukleolus sowie die Bereiche der Chromozentren zeigen keine Immunofluoreszenzsignale und indizieren ein Fehlen oder nur ein geringes Vorkommen dieser Modifikationen in diesen Chromatinbereichen. Dieses Verteilungsmuster zeigt mit fortschreitender Seneszenz jedoch graduelle Veränderungen. Dabei wird insbesondere in dem späten Seneszenzstadium S2 eine weniger uniforme, mehr granuelle Strukturierung der detektierten Immunofluoreszenzsignale erkennbar. Das Vorkommen dieser eher „gesprenkelten“ Verteilung wurde im Verhältnis zu der Gesamtzahl aller untersuchten Kerne ($n \geq 100$) analysiert (Abbildung III-3E). Für beide euchromatischen Modifikationen wird dabei ersichtlich, dass im S1-Stadium etwa ein Drittel und im späten S2-Stadium etwa zwei Drittel der analysierten Kerne eine stärkere Strukturierung der Immunofluoreszenzsignale zeigen.

III.2.2 Veränderungen der Verteilungsmuster repressiver Histonmodifizierungen von Interphasekernen während der Seneszenz.

Um Informationen über die Verteilung repressiver Histonmodifikationen in Zellkernen während der Seneszenz zu erhalten, erfolgten unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen H3K9me2, einer typischen heterochromatinassoziierten Modifikation sowie H3K27me3, einer repressiven jedoch euchromatisch lokalisierten Modifikation, ebenfalls immunozytologische Analysen (Abbildung III-3B). In Kernen aus nicht seneszenten Blättern (NS) kolokalisiert das Fluoreszenzsignal der detektierten H3K9me2-Modifikation distinkt mit den Bereichen der Chromozentren. Neben dieser dominanten Lokalisation sind wenige kleinere punktförmige Signale über den Rest des Kerns verteilt. Dies bestätigt die erwartete Assoziation von H3K9me2 mit heterochromatischen Chromatinbereichen. In den beiden untersuchten Seneszenzstadien S1 und S2 kommt es allerdings zu einer deutlichen Veränderung des H3K9me2-Immunofluoreszenzsignals. So sind bereits im S1-Stadium die Signale deutlich diffuser.

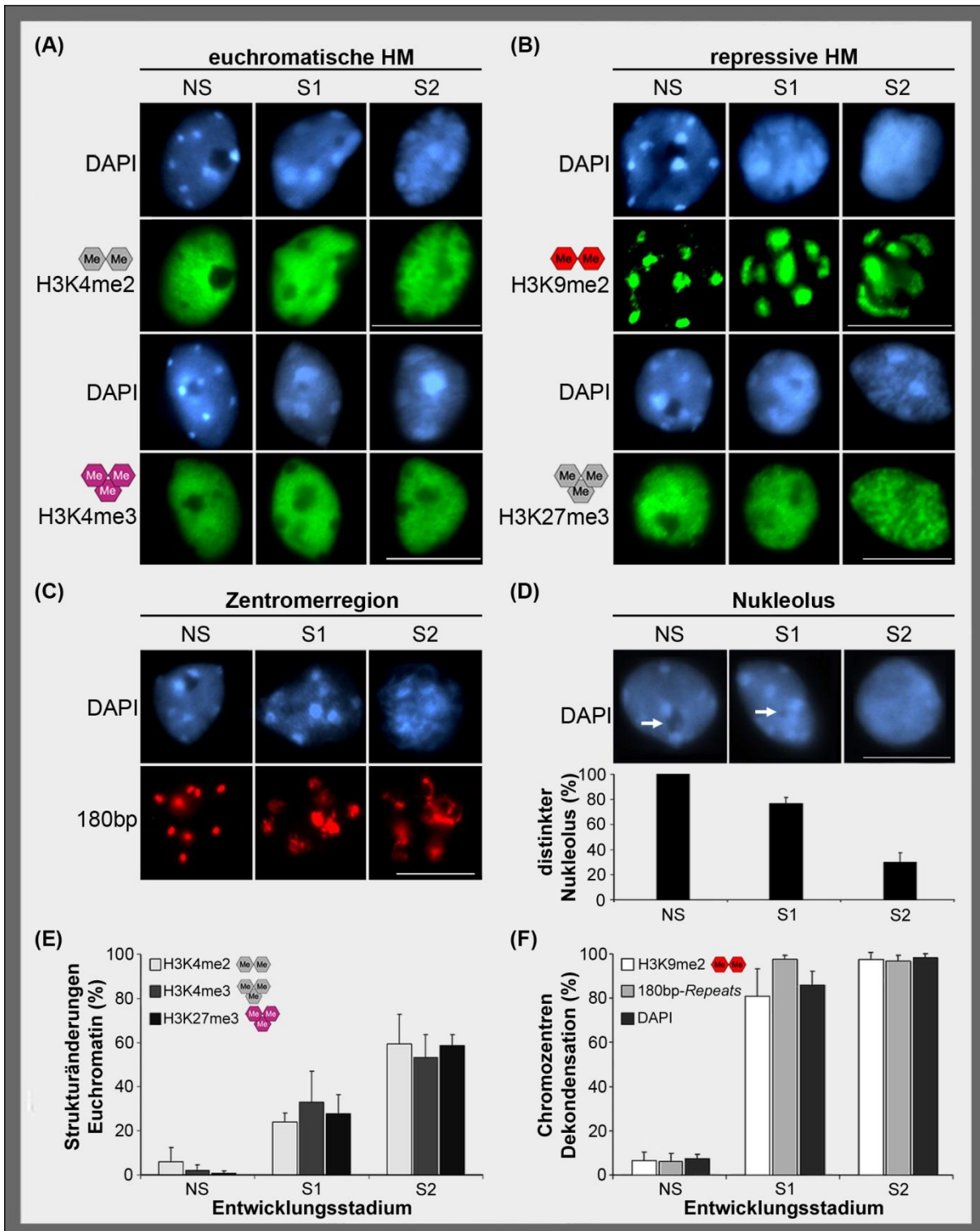


Abbildung III-3: Veränderungen der Chromatinorganisation während der Blattseneszenz. Interphasezellkerne wurden aus Arabidopsisblättern (WT Col-0; jeweils Blatt 5 oder 6) für drei verschiedene Entwicklungsstadien (NS, S1 und S2) isoliert. Gezeigt sind repräsentative Kerne der immunohistochemischen Analysen der seneszenzspezifischen Veränderungen der nukleären Verteilung der euchromatischen Histonmodifikationen (HM) H3K4me2 und H3K4me3 (A) sowie der repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (B). (C) FiSH-Analysen der Veränderungen der chromatinweiten Verteilung des 180bp-Repeats (180bp; core repeat) in Interphasekernen während der Seneszenz. Für jede untersuchte Modifikation sind im oberen Teil die DAPI-Fluoreszenz und im unteren Teil die grün (immunozytologische Analysen) bzw. rot (FiSH-Analysen) dargestellte Fluoreszenz der korrespondierenden Kerne abgebildet. Es sind Größenstandards (jeweils = 10µm) als weiße dünne Linie gegeben. (D) Veränderung des Nukleolus während der Seneszenz. Oberer Teil: Gezeigt ist die DAPI-Färbung repräsentativer Interphasekerne für drei verschiedenen Entwicklungsstadien (NS, S1 und S2). Weiße Pfeile kennzeichnen deutlich erkennbare Nukleoli. Unterer Teil: Quantifizierung in Prozent (%) distinkt erkennbarer Nukleoli in Zellkernen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien (n ≥ 500). Weiterhin sind die Ergebnisse der Quantifizierung in Prozent (%) von Zellkernen mit einer veränderten Verteilung der euchromatischen H3K4me2, H3K4me3 und H3K27me3 immunozytologischen Signale (E) sowie von Zellkernen mit erkennbarer Dekondensation der Chromozentren, die sich durch Veränderungen der DAPI-Fluoreszenz, der Umverteilung des H3K9me2 immunozytologischen Signals sowie des 180bp-

Repeat FiSH-Signals zeigte (F). Die quantifizierten Daten zeigen Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung für vier biologische Replikate. ($n \geq 100$ Kerne für jede Analyse und jedes Entwicklungsstadium).

Dieser Effekt ist im späteren S2-Stadium noch wesentlich ausgeprägter. Erneut wurde die Veränderung des Immunofluoreszenzsignals in allen drei untersuchten Blattstadien quantifiziert. Wie in Abbildung III-3F gezeigt, kommt es bereits in 80% der untersuchten Kerne ($n \geq 100$) im S1-Stadium, dem Stadium, bei dem gehäuft signifikante Änderungen der Genexpression detektiert wurden (s. Kapitel III.1.2), zu einer Umverteilung des H3K9me2-Immunofluoreszenzsignals. Im späten S2-Stadium konnte in nahezu allen Kernen eine Veränderung des Signals beobachtet werden. Für die repressive H3K27me3-Markierung wurde ein ähnliches Verteilungsmuster wie für die beiden anderen untersuchten euchromatischen Modifikationen H3K4me2 und H3K4me3 festgestellt. Auch die beobachtete stärkere Strukturierung des Immunofluoreszenzsignals während der Seneszenz ist für die H3K27-Trimethylierung kennzeichnend (Abb. III-3B) und ergab bei der Quantifizierung dieser Beobachtung ähnliche Werte wie für H3K4me2 und H3K4me3 (Abb. III-3E).

III.2.3 Dekondensation der Chromozentren während der Seneszenz.

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, wird die Verteilung des H3K9me2-Immunofluoreszenzsignals mit Beginn der Seneszenz diffuser. Analog dazu zeigen die durch die DAPI-Färbung sichtbaren Bereiche der Chromozentren in seneszenten Blättern ein verändertes Fluoreszenzsignal (Abbildung III-3A und B). Im Gegensatz zu Kernen aus reifen Kontrollblättern scheinen die Chromozentren sukzessive während der Seneszenz zu dekondensieren. Diese Beobachtung wurde ebenfalls quantifiziert (Abbildung III-3F). In über 85% der analysierten Kerne ($n \geq 500$) wurde ein diffuseres Signal der DAPI-Fluoreszenz an den Chromozentren detektiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für die analysierte H3K9me2-Modifikation. Um weiterhin zu klären, ob die diffuser werdenden Fluoreszenzsignale nur durch eine Veränderung von perizentromerischen Bereichen oder auch der Zentromeren selbst verursacht werden, wurde mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FiSH) die Verteilung des Zentromer-spezifischen 180bp-*Repeats* (Maluszynska und Heslop-Harrison 1991; Franz et al. 1998) in Interphasekernen während der Seneszenz untersucht (Abbildung III-3C). In Kernen aus reifen Blättern konnte die erwartete distinkte Häufung des 180bp-*Repeat*-spezifischen Signals mit den kondensierten Bereichen der Chromozentren beobachtet werden. Während der Seneszenz jedoch kommt es, in Übereinstimmung mit der ebenfalls untersuchten Lokalisation von H3K9me2, zu einer Ausdehnung des 180bp-*Repeat*-Fluoreszenzsignals. Auch diese Beobachtung wurde quantifiziert und zeigte, dass im S1-Stadium mehr als 90% aller analysierten Kerne ($n \geq 100$) diese Veränderung aufweisen (Abb. III-3F). Demnach kommt es bereits in einem relativ frühen Stadium der Seneszenz zu massiven Veränderungen der Struktur perizentromerischer Bereiche sowie der Zentromere.

III.2.4 Veränderungen der Nukleoli während der Seneszenz.

Zusätzlich zu den detektierten Veränderungen in der Verteilung euchromatischer und vor allem heterochromatischer Chromatinmodifikationen wurde beobachtet, dass in über 20% der untersuchten Kerne des S1-Stadiums ($n \geq 500$) der Nukleolus entweder deutlich verkleinert oder nicht mehr eindeutig identifizierbar war (Abbildung III-3D). Im späten S2-Stadium konnte in über 75% der Kerne ($n \geq 500$) kein Nukleolus eindeutig identifiziert werden.

Zusammenfassend zeigen die immunozytologischen und FiSH Analysen, dass es während der Seneszenz zu globalen Veränderungen der Chromatinstruktur sowohl in euchromatischen als auch in heterochromatischen Bereichen, kommt. Dabei wurde insbesondere eine Umstrukturierung des Heterochromatins festgestellt. Die Änderungen der Verteilungsmuster der untersuchten Chromatinmodifikationen zeigten sich dabei bereits im S1-Stadium. Für dieses Stadium wurden ebenfalls deutliche Veränderungen der Genexpressionsmuster wichtiger regulatorischer Komponenten der Seneszenz nachgewiesen (s. Kapitel III.1.2). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es auch lokal an SAGs zu einer Umprogrammierung der Chromatinstruktur durch chromatinmodifizierende Mechanismen während der Seneszenz kommen könnte.

III.3 Untersuchungen des lokalen Chromatinstatus ausgewählter SAGs während der Seneszenz.

Drei der acht hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens analysierten SAGs (s. Kapitel III.1.2) wurden ausgewählt, um die Histonmodifikationsmuster dieser Gene während der Seneszenz zu untersuchen. Neben dem bekanntesten SAG *SAG12*, wurden die zwei für seneszenzassoziierte TFs kodierenden Gene *ANAC083* und *WRKY53* analysiert. Dazu sollte die Methode der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) genutzt und für die Verwendung an seneszentem Blattmaterial etabliert werden. Bei der ChIP-Methode werden, unter Verwendung eines Antikörpers gegen ein DNA-assoziiertes Protein oder gegen eine bestimmte Modifikation eines assoziierten Proteins die entsprechenden Chromatinfragmente präzipitiert. Anschließend kann der Anteil distinkter DNA-Bereiche über PCR-Methoden identifiziert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit sollte zum einen mit spezifischen Antikörpern gegen die posttranslationalen Histonmodifikationen H3K4me₂, H3K4me₃, H3K9me₂ und H3K27me₃ untersucht werden, ob die ausgewählten Zielgene mit Histonen assoziiert vorliegen, die die genannten Modifikationen tragen. Zum anderen sollte analysiert werden, ob es zu Änderungen dieser Markierungsmuster während der Seneszenz kommt. Dazu wurde Chromatin von Blättern des nicht seneszenten Kontrollstadiums (NS), bei dem die Expression der drei zu untersuchenden SAGs minimal ist sowie aus Blättern des S1-Stadiums, bei dem es jeweils zu einem signifikantem Anstieg der Transkriptgehalte kommt (s. Kapitel III.1.2), untersucht.

III.3.1 Etablierung der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) für das Arabidopsis-Seneszenzsystem.

Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen gab es keinerlei Informationen über den Zustand von Chromatin aus seneszentem Blattgewebe oder die Anwendbarkeit der ChIP in diesem System. Da es während der Seneszenz zu massiven Degradations- und Recyclingprozessen kommt, sind eine Vielzahl von katabolen Enzymen wie Proteasen und Nukleasen aktiv. Entsprechend wurde das verwendete Protokoll, das auf veröffentlichten Daten von Gendrel et al. (2002) und Lawrence et al. (2004) basiert, optimiert (Ay et al. 2009 sowie Kapitel V.2.5.13). Die Quantifikation der DNA aus dem immunopräzipitierten Material erfolgte über quantitative *realtime* PCR (qPCR). Dazu wurde neben den Immunopräzipitationen (IPs) für jedes untersuchte Stadium DNA aus einem definierten Teil der Chromatinextrakte ohne eine zwischengeschaltete Immunopräzipitation gewonnen und genutzt, um die %-Inputwerte (%I) zu bestimmen. Aus dieser sog. Input-DNA wurde eine Verdünnungsreihe generiert, anhand derer der prozentuale Anteil für jede über die IP extrahierte DNA relativ zur Input-DNA berechnet werden konnte (s. Kapitel V.2.5.13). In den ChIP-Analysen erfolgte die Untersuchung der bereits in den globalen immunozytologischen Analysen verwendeten Histonmethylierungen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3. Zu Beginn der Untersuchungen gab es ebenfalls keine publizierten Daten darüber, welche Referenzgene für ChIP-Analysen in seneszenten Systemen verwendet werden können. Solche Gene sind wichtig, um die Effizienz der IP zu analysieren und um die Daten der Zielgene mit denen der Referenzgene der jeweiligen Probe normalisieren, d. h. aufeinander abgleichen zu können. Geeignete Referenzgene bzw. DNA-Bereiche sollten dabei stabil mit der entsprechenden Modifikation in den zu vergleichenden Proben markiert sein. Daher wurde ein Set von DNA-Sequenzbereichen ausgewählt (s. Appendix A.1; Tab. A.1), die auf ihre Eignung als Referenzsequenzen im seneszenten System hin untersucht werden sollten. Die möglichen Referenz-DNA-Bereiche wurden dafür zusammen mit den drei Zielgenen über ChIP analysiert. Für einen Teil der untersuchten Referenzgene sind die erhaltenen Ergebnisse der ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen die vier ausgewählten Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 sowie H3K27me3 aus sechs biologischen Replikaten für die zwei untersuchten Entwicklungsstadien NS und S1 im Appendix in Abbildung A-1 gezeigt. Anhand dieser Daten erfolgte die Auswahl der nachstehenden Referenz-DNA-Regionen für die Normalisierung der SAG-IP-Daten. Die für die Normalisierung der IP-Daten ausgewählten Referenz-DNA-Bereiche sind im Appendix in Abbildung A-1A und B für jede Histonmodifikation grau hinterlegt. Sowohl für die Di- als auch die Trimethylierung von H3K4 erwies sich die *TUA4-II*-Region des *TUA4*-Gens (*TUBULIN ALPHA-4*; kodierende Sequenz; Exon 2) als geeignete DNA-Region für die Normalisierung. Das *180bp single repeat (180bp SR)* wurde für die Normalisierung der ChIP-Zielgendaten, die für die H3K9me2-Modifikation erhalten wurden, ausgewählt. Für die IPs mit den drei genannten Antikörpern (H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2) erfolgte die Normalisierung der

%Inputwerte (%I) der Zielgene eines Entwicklungsstadiums für jedes biologische Replikat auf die entsprechenden %I der ausgewählten Referenz-DNA-Sequenz (s. Kapitel V.2.5.13). Für die Normalisierung der H3K27me3-ChIP-Daten wurde die *SAG12-II*-Region ausgewählt (s. Appendix A.1; Abb. A-1B). In diesem Fall erfolgte jedoch die Normalisierung der %I beider Stadien des Zielgens auf die %I von *SAG12-II* von nicht seneszenten (NS) Blättern, da die Markierung mit H3K27me3 nicht stabil über die Seneszenz an dieser Region war (s. Appendix A.1; Abb. A-1B). In zukünftigen Untersuchungen, bezüglich der biologischen Bedeutung der Trimethylierung von H3K27 an *SAG12*, sollte daher parallel die Analyse eines stabil mit H3K27me3-markiertem DNA-Bereiches untersucht werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden hierfür zu späteren Zeitpunkten bereits erste Untersuchungen vorgenommen (s. Appendix Tab. A.1; Abb. A-3). Dabei wurde die *AG-I*-Region von *AGAMOUS* (AT4G18960) als mögliche Referenzregion identifiziert.

Um Abbauprozesse während der ChIP, die aufgrund der gesteigerten Aktivität von Proteasen und DNA-Nukleasen in seneszenten Geweben während der Aufarbeitung wahrscheinlich sind, auszuschließen, wurde zudem untersucht, ob die erhaltenen DNA-Mengen aus beiden untersuchten Stadien vergleichbar sind. Dazu wurden Chromatinpräparationen aus NS und S1 für jedes Experiment hinsichtlich der enthaltenen DNA-Mengen analysiert. Für alle untersuchten Amplikons wurden in der qPCR keine deutlichen Unterschiede der CT-Werte (≥ 1) zwischen den beiden Stadien festgestellt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin erfolgte neben den bereits erwähnten IPs mit spezifischen Antikörpern gegen N-terminale Histonmethylierungen an Histon H3, parallel eine IP mit einem Antikörper gegen den nicht modifizierten C-terminalen Teil von H3. Dieser Antikörper erkennt, unabhängig von einer posttranslationalen Modifikation, H3. Führt man ChIP-Analysen mit einem solchen Antikörper durch, können mehrere Rückschlüsse, je nach Präzipitationsverhalten, getroffen werden. Zum einen zeigen die erhaltenen DNA-Mengen, ob die IP überhaupt erfolgreich funktioniert hat. Zum anderen erhält man Aufschluss darüber, ob die Präzipitation in allen untersuchten und zu vergleichenden Proben mit einer ähnlichen Effizienz erfolgt ist. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass Veränderungen der Genexpression mit einer Veränderung der Dichte bzw. der Anordnung der Nukleosomen einhergehen können (Bai und Morozov 2010). Je nach Kondensationsgrad des Chromatins an einem bestimmten Locus kann sich auch die Menge assoziierter Histone verändern. So können Informationen darüber gewonnen werden, ob es an untersuchten DNA-Bereichen zu Veränderungen der Nukleosomendichte, also des Packungszustandes des Chromatins kommt, sofern man artifizielle Abbauprozesse von Proteinen während der ChIP-Analysen ausschließen konnte. Die Ergebnisse der IP mit dem H3C-Antikörper für die drei zu untersuchenden SAGs sowie aller verwendeter Referenz-DNA-Regionen sind im Appendix in Abbildung A-4 dargestellt. Für alle untersuchten Loci konnten keine signifikanten Unterschiede der Nukleosomendichte in beiden Entwicklungsstadien festgestellt werden.

III.3.2 Histonmodifikationsmuster an SAGs während der Seneszenz.

Nachfolgend sollten nun die Histonmodifikationsmuster und die Korrelationen mit der seneszenzabhängigen Expression für die drei SAG-Markergene *SAG12*, *ANAC083* und *WRKY53* untersucht werden.

III.3.2.1 Histonmodifikationsmuster an *SAG12* während der Seneszenz.

SAG12 ist eines der am stärksten während der Seneszenz exprimierte SAGs (Noh und Amasino 1999). Das Gen setzt sich aus drei Exons, die von zwei Introns unterbrochen werden, zusammen (Abbildung III-4A) und kodiert für eine Cysteinprotease. Im Vorfeld wurden bekannte Daten für die vier Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 des *USCS Arabidopsis Genome Browsers* (<http://epigenomics.mcdb.ucla.edu/>), die aus genomweiten ChIP-Analysen an Keimlingen bzw. jungen Pflanzen stammen, verwendet, um den Chromatinstatus am *SAG12*-Gen zu dokumentieren (Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2007; Bernatavichute et al. 2008). In Abbildung III-4B sind die entsprechenden Daten für die zu untersuchenden Histonmethylierungen gezeigt. So wurde an *SAG12* in Keimlingen weder H3K4me2 noch H3K4me3 detektiert. Allerdings konnte eine deutliche Assoziation von *SAG12*-Bereichen etwa 1 bp bis 500 bp *up-* sowie 200 bp bis 1000 bp *downstream* des Transkriptionsstarts (TKS) mit der repressiven H3K27me3-Modifikation detektiert werden. Interessanterweise ist in dem dazwischen gelegenen Bereich 1 bp bis etwa 150 bp *downstream* des TKSs H3K27me3 deutlich reduziert und steigt erst danach wieder an. In dieser H3K27me3-armen Genregion wurde ein kurzer Abschnitt, der mit der H3K9me2-Modifikation angereichert ist, identifiziert. Rund um diesen interessanten Bereich des TKSs wurden zwei verschiedene Primerpaare ausgewählt (dargestellt in Abbildung III-4A), die für die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA verwendet werden sollten. In den ChIP-Analysen erfolgte die IP parallel an Chromatin, das aus reifen Blättern (Abb. III-4C; NS: *SAG12* sehr schwach exprimiert; Detektionsgrenze der qRT-PCR) und aus seneszenten Blättern (Abb. III-4C; S1-Stadium: deutliche Expression von *SAG12*) extrahiert wurde. Die Ergebnisse der Assoziation von *SAG12* mit den entweder transkriptionsaktives Chromatin markierenden (H3K4me2 und H3K4me3) oder transkriptionsinaktives Chromatin markierenden (H3K9me2 und H3K27me3) Histonmethylierungen sind jeweils in Abbildung III-4D und E zusammengefasst. Dargestellt sind die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (Appendix A.1 sowie Kapitel V.2.5.13) Daten von sechs biologischen Replikaten. Für beide untersuchten *SAG12*-DNA-Bereiche (*SAG12-I* und *SAG12-II*) wurden relativ geringe Mengen der euchromatischen H3K4me2 und H3K4me3-Modifikationen in reifen Blättern detektiert. Dabei verbleibt die Stärke der Assoziation mit H3K4me2 auch im S1-Stadium, bei dem es zur massiven Induktion der Expression von *SAG12* kommt, auf relativ niedrigem Niveau. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Trimethylierung von H3K4 an beiden untersuchten DNA-Bereichen von *SAG12*.

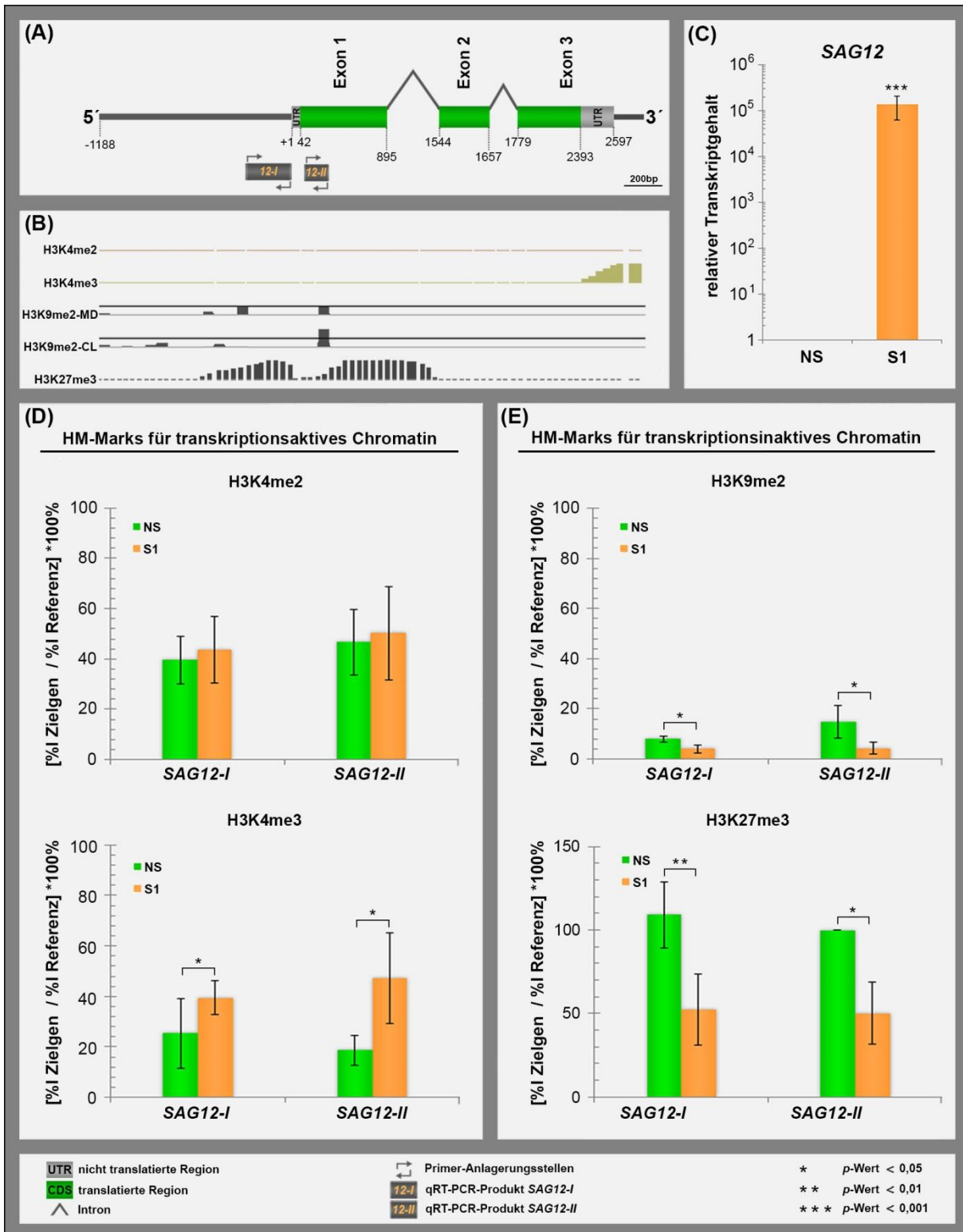


Abbildung III-4: Histone Modifikationsmuster an *SAG12* in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *SAG12* (AT5G45890) sowie der etwa 1200 bp *upstream* des TKS liegende Promotorbereich. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*SAG12-I* und *SAG12-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z-score*) des *USCS Arabidopsis Genome Browser* zu den unter A dargestellten korrespondierenden Genbereichen für die vier untersuchten Histone Modifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Daten aus zwei Ansätzen dargestellt, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinken* und Ultraschall behandeltem Chromatin (CL). (C) Hier sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *SAG12* (s. Kapitel III.1.2) für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und der korrespondierenden Histone Modifikationsmuster gezeigt. Weiterhin sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien abgebildet, die unter Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histone Modifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) sowie die repressiven Histone Modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *SAG12*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen biologischen Replikaten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Die

Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Dennoch ist die Stärke der Markierung der untersuchten *SAG12*-Regionen deutlich kleiner als die des zur Normalisierung verwendeten Referenzgens *TUA4*. Weiterhin ergaben die IPs gegen die H3K9me2-Modifikation eine relativ schwache Markierung der *SAG12*-assoziierten Histone mit dieser Modifikation in den beiden untersuchten Genbereichen im NS-Stadium (Abb. III-4E). Allerdings konnte ein signifikanter Abfall von H3K9me2 im S1-Stadium festgestellt werden. Weiterhin zeigten die IPs unter Verwendung des H3K27me3-Antikörpers ein deutliches Vorkommen dieser repressiven Histonmodifikation im NS-Stadium an den untersuchten *SAG12*-Genbereichen. Interessanterweise wurden an beiden *SAG12*-Genbereichen im S1-Stadium deutlich geringere Mengen DNA über die H3K27me3-IP detektiert.

Demnach kommt es im S1-Stadium, in dem die Transkription von *SAG12* massiv gesteigert ist, zum einen zu einem Anstieg der aktivierenden H3K4me3-Modifikation und zum anderen zum Verlust der repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 im Bereich des TKSs.

III.3.2.2 Histonmodifikationsmuster an *ANAC083* während der Seneszenz.

ANAC083 kodiert für einen seneszenzassoziierten NAC TF (*Arabidopsis NAC domain containing protein 83*). Das Gen besteht aus drei Exons, die durch zwei Introns unterbrochen sind (Abbildung III-5A). Abbildung III-5B zeigt die Daten des *USCS Arabidopsis Genome Browsers* für die zu untersuchenden Histonmethylierungen. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass *ANAC083* in Keimlingen mit beiden euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 assoziiert vorliegt. Im Gegensatz dazu wurden weder an der *ANAC083*-Promotorregion, noch an der kodierenden Region des Gens die repressiven Histonmarks H3K9me2 oder H3K27me3 nachgewiesen. Für die Analyse der seneszenzspezifischen Muster der Histonmodifikationen an *ANAC083* wurden wiederum zwei verschiedene Regionen untersucht (Abb. III-5A). Zum einen wurde ein Primerpaar verwendet, das eine Promotorregion etwa 500 bp *upstream* des TKS (*ANAC083-I*) und zum anderen eines, das einen Abschnitt des dritten Exons der kodierenden Sequenz (CDS) amplifiziert (*ANAC083-II*). Dabei erfolgten die ChIP-Analysen erneut parallel an Chromatin reifer (Abb. III-5C; NS-Stadium: *ANAC083* basal exprimiert) und seneszenten Blätter (Abb. III-5C; S1-Stadium: deutliche Expression von *ANAC083*). Die Ergebnisse der ChIP von *ANAC083* mit H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 sind in Abbildung III-5D und E zusammengefasst. Dargestellt sind die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (Appendix A.1 sowie Kapitel V.2.5.13) Daten aus vier biologischen Replikaten. Für *ANAC083-I* wurden relativ geringe Mengen der euchromatischen H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen in reifen Blättern detektiert. Jedoch kommt es im S1-Stadium zu einem deutlichen Anstieg von H3K4me2. Im Gegensatz dazu wurden unverändert niedrige Werte für H3K4me3 im S1-Stadium detektiert.

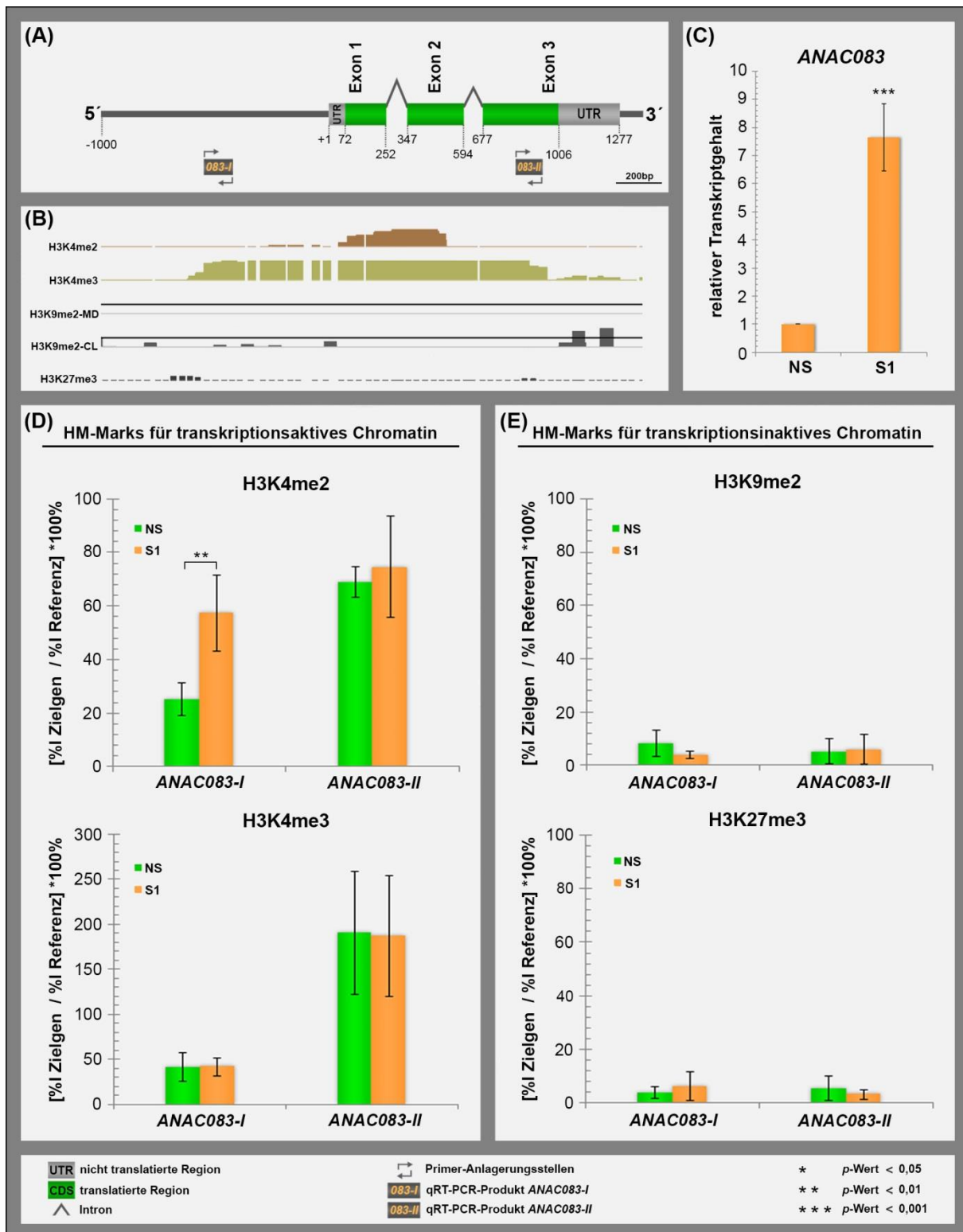


Abbildung III-5: Histonmodifikationsmuster an *ANAC083* in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *ANAC083* (AT5G13180) sowie 1000 bp der DNA-Sequenz *upstream* des TKS. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*ANAC083-I* und *ANAC083-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z-score*) des *USCS Arabidopsis Genome Browsers* zu den korrespondierenden Genbereichen (unter A) für die vier untersuchten Histoneifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Muster aus zwei Ansätzen, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren, dargestellt. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinken* und Ultraschall-behandeltem Chromatin (CL). (C) Hier sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *ANAC083* (s. Kapitel III.1.2) für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und den korrespondierenden Histoneifikationsmuster gezeigt. Weiterhin sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien abgebildet, die unter Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histoneifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) sowie die repressiven Histoneifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *ANAC083*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt beruht auf vier unabhängigen biologischen Replikaten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung).

Die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Deutlich höhere Mengen der beiden euchromatischen Modifikationen konnten an der zweiten untersuchten Region im kodierenden Bereich des *ANAC083*-Gens (*ANAC083-II*) in reifen Blättern gefunden werden. Allerdings kommt es zu keinen Veränderungen der H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen an diesem Genbereich im S1-Stadium. Für die beiden repressiven Modifikationen (H3K9me2 und H3K27me3) konnte nur ein sehr geringes Vorkommen an beiden untersuchten *ANAC083*-Regionen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich auch für diese beiden Histonmodifikationen keine Veränderungen im S1-Stadium.

Demnach ist die Chromatinumgebung von *ANAC083* in beiden analysierten Stadien durch aktivierende Histonmodifikationen gekennzeichnet. An der Promotorregion *ANAC083-I* kommt es zudem seneszenzabhängig zu einer leichten zusätzlichen Etablierung der H3K4me2-Modifikation. Des Weiteren konnte kaum ein Vorkommen von Histonen mit den repressiven Modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 an den untersuchten *ANAC083*-Genbereichen in beiden untersuchten Entwicklungsstadien festgestellt werden.

III.3.2.3 Histonmodifikationsmuster an *WRKY53* während der Seneszenz.

WRKY53 kodiert für einen TF der WRKY-Familie, der als ein zentraler Regulator von Seneszenzprozessen bekannt und für die Regulation der Expression vieler weiterer SAGs verantwortlich ist (Miao et al. 2004). Das Gen setzt sich aus zwei Exons zusammen, die von einem Intron unterbrochen werden (Abbildung III-6A). Abbildung III-6B zeigt den Zustand des Chromatins an *WRKY53* in Keimlingen bezüglich der zu untersuchenden Histonmodifikationen, die durch globale Analysen erfasst wurden (*USCS Arabidopsis Genome Browser*). Dabei ist ersichtlich, dass weite Bereiche des Gens mit Histonen assoziiert vorliegen, die durch die Di- und Trimethylierung an H3K4 modifiziert sind. Weiterhin ist eine sehr geringe bzw. keine Assoziation mit den repressiven H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen im Bereich des *WRKY53*-Gens in den genomweiten Chromatinanalysen nachgewiesen worden. Interessanterweise ist das Ausmaß der detektierten H3K4me2 und H3K4me3-Modifikation um den Translationsstart (TLS) deutlich geringer als in den anderen Bereichen des Gens. Dieser Bereich wurde durch die Amplifikation des *WRKY53-I*-Fragmentes (dargestellt in Abb. III-6A), der durch ChIP isolierten DNA, analysiert. Des Weiteren wurde eine zweite Region untersucht (*WRKY53-II*; dargestellt in Abb. III-6A), die im Bereich des zweiten Exons lokalisiert ist. Auch für *WRKY53* erfolgten die IPs parallel an Chromatin, das aus reifen Blättern (Abb. III-6C; NS-Stadium: *WRKY53* basal exprimiert) und aus seneszenten Blättern (Abb. III-6C; S1- Stadium: deutliche Expression von *WRKY53*) extrahiert wurde. Die Ergebnisse der ChIP-Analysen für *WRKY53* sind in Abbildung III-6D und E zusammengefasst.

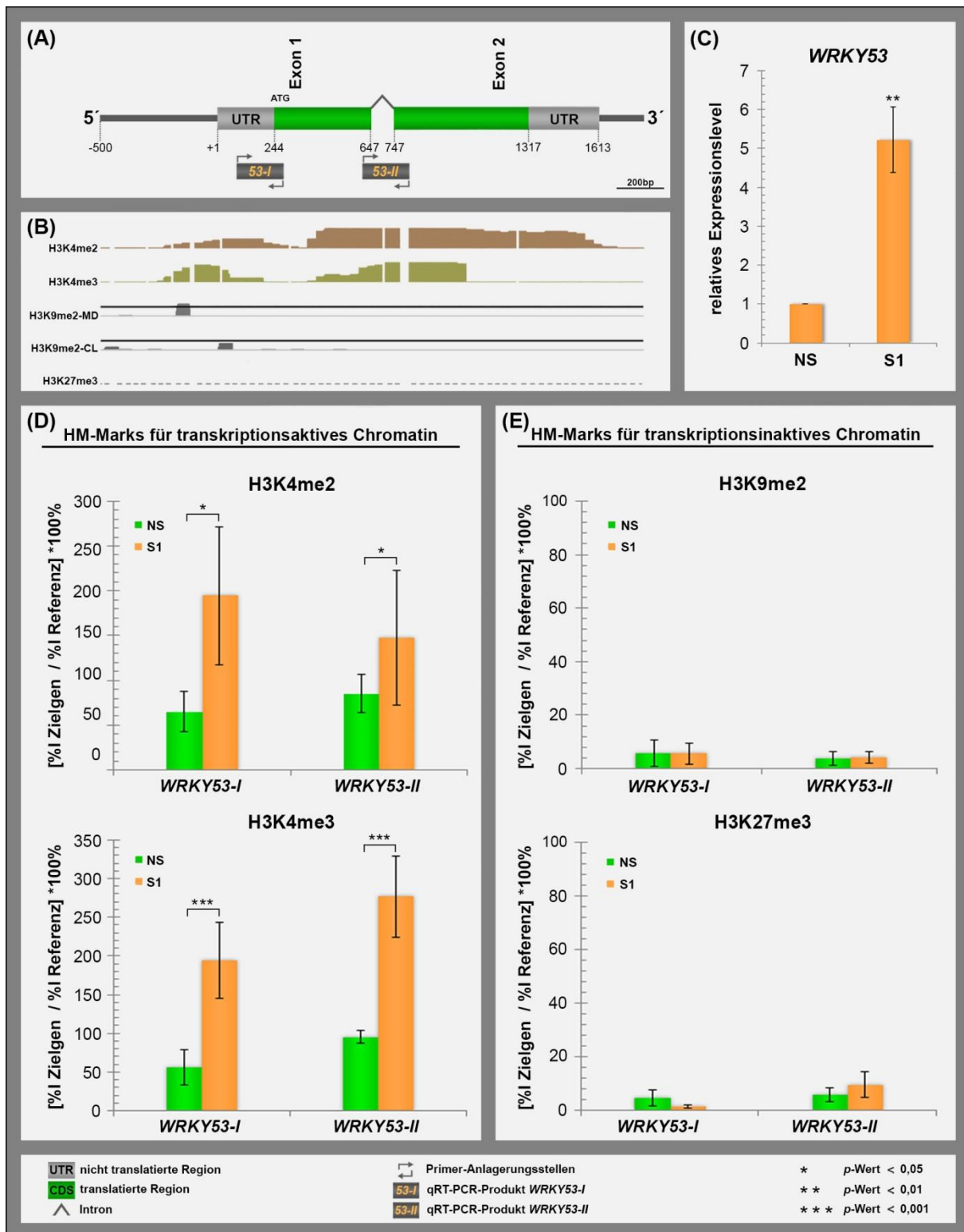


Abbildung III-6: Histone-modifikationsmuster an *WRKY53* in reifen und seneszenten Arabidopsisblättern. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *WRKY53* (AT4G23810) sowie 500 bp der DNA-Sequenz *upstream* des TKS. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*WRKY53-I* und *WRKY53-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z-score*) des *USCS Arabidopsis Genome Browser*s zu den korrespondierenden Genbereichen (unter A) für die vier untersuchten Histone-modifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Muster aus zwei Ansätzen, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren, dargestellt. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinken* und Ultraschall-behandeltem Chromatin (CL). (C) Hier sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *WRKY53* (s. Kapitel III.1.2) für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und den korrespondierenden Histone-modifikationsmustern gezeigt. Weiterhin sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien abgebildet, die unter Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histone-modifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) sowie die repressiven Histone-modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *WRKY53*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen biologischen Replikaten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Die Quantifizierung der

immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Dargestellt sind die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (Appendix A.1 sowie Kapitel V.2.5.13) Daten von sechs biologischen Replikaten. Für beide analysierten *WRKY53*-Regionen konnten bereits im NS-Stadium moderate Mengen der euchromatischen H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen detektiert werden (Abb. III-6D). Dabei wurde für *WRKY53-I* jeweils weniger H3K4me2 und H3K4me3 nachgewiesen als an *WRKY53-II*. Im S1-Stadium, bei dem es zu einer deutlichen Induktion der Expression von *WRKY53* kommt, wurde an beiden Genbereichen signifikant mehr H3K4me2 und H3K4me3 quantifiziert. Dieser Anstieg ist besonders stark an der Region *WRKY53-I* ausgeprägt. Im Gegensatz zu den untersuchten Methylierungen an H3K4 konnten für die beiden repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 nur sehr geringe Mengen an beiden Regionen und in beiden untersuchten Stadien detektiert werden.

Folglich kommt es im S1-Stadium, bei dem die Transkription von *WRKY53* gesteigert ist, zu einem deutlichen Anstieg aktivierender Histonmodifikationen (H3K4me2 und H3K4me3) insbesondere in dem Bereich um den TLS. Des Weiteren konnte kaum ein Vorkommen von Histonen mit repressiven Modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 an den untersuchten *WRKY53*-Genbereichen und beiden Entwicklungsstadien festgestellt werden.

III.4 Übersicht chromatinassoziierter Schlüsselfaktoren und ihr möglicher Einfluss auf Seneszenzprozesse.

Über die Analyse des Seneszenzverlaufs an transgenen *loss*- und *gain-of-function* Pflanzen mit veränderter Aktivität bekannter chromatinassoziierter Faktoren sollte im Folgenden untersucht werden, ob die detektierten Unterschiede der Histonmodifikationen an einigen der untersuchten SAGs tatsächlich Veränderungen der Genexpression bewirken können und welche Faktoren möglicherweise im Seneszenzprozess an der Umgestaltung der globalen und lokalen Veränderungen beteiligt sein könnten. Zu Beginn der Arbeiten stand ein großes Set von Mutanten- und Überexpressionslinien zur Verfügung, die z. T. aus einem *TGS-Suppressor-Screen* stammen, der in der AG von Prof. Dr. Reuter (MLU Halle-Wittenberg; Hofmann 2004) durchgeführt wurde. Mit einem Teil dieser Linien sowie weiteren transgenen Linien chromatinassoziierter Faktoren erfolgte in Vorarbeiten in der AG von Prof. Dr. Klaus Humbeck (MLU Halle-Wittenberg) ein grobes Seneszenzscreening. Dabei untersuchten Ria Uhlemann und Konstanze Wiedemuth die transgenen Pflanzen hinsichtlich ihres Phänotyps und insbesondere bezüglich des Verlaufs der Blattseneszenz. In Tabelle III.1 ist eine Auswahl, der untersuchten Linien zusammengestellt. Unter den getesteten Faktoren befanden sich auch die Histon-modifizierenden Faktoren ATX1, ATX2 (ARABIDOPSIS HOMOLOGUE OF TRITHORAX 1 und 2), HDA6, (HISTONE DEACETYLASE 6), SUVH1, 2, 4 und 9 (SU(VAR)3-9 HOMOLOG 1, 2, 4 und 9). Dabei zeigten transgene Linien der *SUVH1*, *SUVH2*- und *HDA6*-Gene einen Phänotyp im Seneszenzverhalten.

Da sich in den Vorversuchen die stärksten Effekte auf den Verlauf der Blattseneszenz für eine Überexpressionslinie der putativen Histonmethyltransferase SUVH2 zeigten, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die genaue Analyse transgener SUVH2-Linien. Dabei sollte neben der genannten Überexpressionslinie auch eine T-DNA-Insertionslinie charakterisiert und hinsichtlich des Effekts auf die Seneszenz untersucht werden. Sofern sich der beobachtete Phänotyp im etablierten Seneszenzscreening für die SUVH2-Überexpressionslinie bestätigen würde, sollten die molekularen Effekte, die die Veränderung der SUVH2-Expression verursacht, näher analysiert werden.

Tabelle III.1. Untersuchungen des Seneszenzverlaufs von *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Linien chromatinassoziierter Faktoren.

AGI-Code	Gen	Name	Linien- ursprung	Linien- kennung	Funktion	Seneszenz- Phänotyp
AT5G66750	<i>DDM1</i>	DECREASED DNA METHYLATION 1	EMS	<i>ddm1</i>	Chromatin remodeling	+
AT2G21790	<i>RNR1</i>	RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE 1 - große UE	EMS	<i>rnr1</i>	DNA-Replikation / DNA-Reparatur	-
AT3G18730	<i>BRU1</i>	BRUSHY1	EMS	<i>bru1</i>	Regulation euchromatischer Gene	-
AT5G63110	<i>HDA6</i>	HISTONE DEACETYLASE 6	EMS	<i>hda6</i>	Histonmodifikation	+
AT5G04940	<i>SUVH1</i>	SU(VAR)3-9 HOMOLOG 1	Überexpression / T-DNA	<i>SUVH1-oe</i>	Histonmodifikation	+ / -
AT2G33290	<i>SUVH2</i>	SU(VAR)3-9 HOMOLOG 2	Überexpression	<i>SUVH2-oe</i>	Histonmodifikation	+
AT5G13960	<i>SUVH4</i>	SU(VAR)3-9 HOMOLOG 4	T-DNA	<i>suvh4</i>	Histonmodifikation	-
AT4G13460	<i>SUVH9</i>	SU(VAR)3-9 HOMOLOG 9	T-DNA	<i>suvh9</i>	Histonmodifikation	-
AT5G17690	<i>LHP1</i>	LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1	T-DNA	<i>lhp1</i>	Gensilencing im Euchromatin	-
AT2G31650	<i>ATX1</i>	ARABIDOPSIS HOMOLOGUE OF TRITHORAX 1	T-DNA	<i>atx1</i>	Histonmodifikation	-
AT1G05830	<i>ATX2</i>	ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE PROTEIN 2	T-DNA	<i>atx2</i>	Histonmodifikation	-
AT5G15380	<i>DRM1</i>	DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1	T-DNA	<i>drm1</i>	DNA-Methylierung	-
AT5G14620	<i>DRM2</i>	DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE	T-DNA	<i>drm2</i>	DNA-Methylierung	-
AT3G23780	<i>MRPD2A</i>	NUCLEAR RNA POLYMERASE D2A	EMS	<i>mrpd2a</i>	DNA-Methylierung	-
AT1G69770	<i>CMT3</i>	CHROMOMETHYLASE 3	EMS / T-DNA	<i>cmt3</i>	DNA-Methylierung	+ / -

Auflistung einer Auswahl von *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Linien chromatinassoziierter Faktoren, die in Voruntersuchungen in einem ersten physiologischen Screening hinsichtlich ihres Seneszenzverlaufs untersucht wurden.

III.4.1 Die putative Histonmethyltransferase SUVH2 und ihr Expressionsverhalten während der Entwicklung.

Das SUVH2-Gen (*SU(VAR)3-9-Homolog 2*; *SUPPRESSOR OF POSITION EFFECT VARIATION 3-9 Homolog 2*) besteht aus zwei Exons sowie einem Intron, das jedoch im 3'-UTR lokalisiert ist (Abbildung III-7A). Das 2424 bp lange Gen enthält eine 1956 bp lange CDS (*coding sequence*), die für ein 651 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein kodiert. Proteinsequenzanalysen von SUVH2 zeigen einen für SU(VAR)3-9-Homologe typischen Aufbau (Abb. III-7B; CDD, *Conserved Domain Database* des NCBI, *National Center of Biotechnology Information*). Im mittleren Bereich der Aminosäuresequenz ist eine 156 AS lange sog. SRA-Domäne (*SET and RING associated domain*) lokalisiert, die auch als YDG-Domäne bezeichnet wird. C-Terminal schließen sich die 93 AS lange Cysteinreiche pre-SET-Domäne bzw. N-SAC-Domäne sowie die 149 AS lange SET-Domäne (SU(VAR)3-9, ENHANCER-of-ZESTE, TRITHORAX-Domäne) an, die Homologie zur SET-Domäne des Proteins SU(VAR)3-9 aus *Drosophila* aufweist. Die Analyse des Expressionsverhaltens von SUVH2 unter Verwendung der

Expressionsdatenbank Genevestigator (Hruz et al. 2008) zeigt, dass *SUVH2* in allen gezeigten Entwicklungsstadien eine relativ geringe Expression in überirdischen Teilen von Arabidopsis-Pflanzen aufweist (Abb. III-7C). Da die Überexpression von *SUVH2* scheinbar zu einer Veränderung von Seneszenzprozessen führt, erfolgte die Überprüfung der Expression im Rahmen des in dieser Arbeit etablierten Seneszenzscreeningssystemes in den definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1 und S2. Wie in Abbildung III-7D zu erkennen, ist die bereits in reifen Blättern relativ geringe Expression von *SUVH2* mit fortschreitender Seneszenz weiter vermindert.

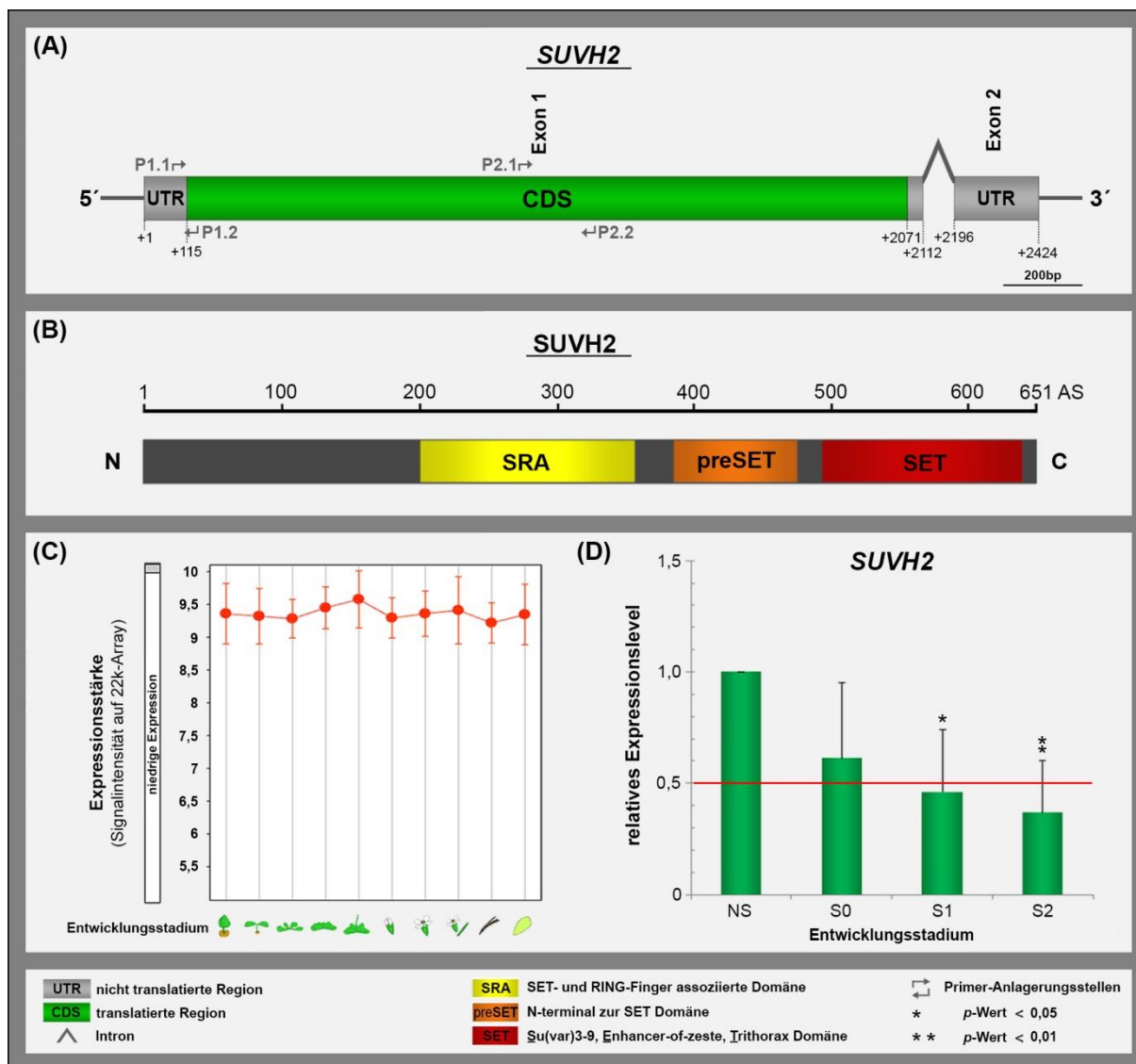


Abbildung III-7: Struktur des *SUVH2* Gens und des kodierten Proteins sowie das Expressionsverhalten von *SUVH2* während der Entwicklung von Arabidopsis WT-Pflanzen. (A) Darstellung des *SUVH2*-Genmodells. (B) Darstellung des *SUVH2*-Proteinmodells. Gezeigt sind die drei Bereiche der SRA-, der pre-SET- sowie der SET-Domäne. (C) Expressionsmuster von *SUVH2* in verschiedenen Entwicklungsstadien und oberirdischen Organen von Arabidopsis. Die Daten stammen aus der *Genevestigator*-Datenbank (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>). Gezeigte Stadien von links: gekeimte Samen, Keimlinge, junge Rosette, entwickelte Rosette, Schossen (*bolting*), junge Blüte, entwickelte Blüte, Blüte und Schote, reife Schote, Seneszenz. (D) Expressionsmuster von *SUVH2* während der Seneszenz. Die relativen Transkriptgehalte wurden mittels qRT-PCR in den drei definierten Seneszenzstadien S0, S1 und S2, bezogen auf die Transkriptgehalte in der nicht seneszenten Kontrolle (NS), die eins gesetzt wurden, bestimmt. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der *18S* rRNA anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten von der Amplifikation mit zwei verschiedenen Primerpaaren mit entsprechender Standardabweichung (Anlagerungsstellen für die verwendeten Primer P1.1 (*forward*) und P1.2 (*reverse*) sowie von P2.1 (*forward*) und P2.2 (*reverse*) sind in III-7A gezeigt). Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) sind durch Sternchen markiert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

III.4.2 Charakterisierung transgener *SUVH2-loss-of-function* und *gain-of-function*-Pflanzen.

Auf Grund des Absinkens des *SUVH2*-Transkriptgehalts während der Blattseneszenz (s. Kapitel III.4.1) sowie der Vorergebnisse eines Seneszenzscreenings von *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen, in dem erste Hinweise auf einen veränderten Verlauf der Blattseneszenz in der AG Humbeck gezeigt werden konnten (s. Kapitel III.4; Tab. III.1), wurden zwei transgene Linien analysiert, bei denen die Expression von *SUVH2* entweder verringert oder deutlich gesteigert sein sollte. Beide Linien wurden im Folgenden bezüglich der *SUVH2*-Expression und des allgemeinen Phänotyps (s. Kapitel III.4.2.1) sowie insbesondere des Seneszenzphänotyps (s. Kapitel III.4.2.2) untersucht.

III.4.2.1 Allgemeine Phänotypisierung von transgenen *SUVH2-loss-of-function*- und *gain-of-function*-Pflanzen.

Die verwendete *SUVH2* T-DNA Insertionslinie (*svh2*-GK) stammt aus der GABI-Kat Sammlung (Kleinboelting et al. 2012) und wurde vom NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*; line-ID: GK-516A07) bezogen. Sie trägt wie in Abbildung III-8B gezeigt eine T-DNA-Insertion am 3'-Ende der kodierenden Sequenz von *SUVH2* im Bereich der SET-Domäne. An genomischer DNA (gDNA), die aus separaten Keimlingen von Samen des WTs und der *svh2*-GK-Linie extrahiert wurde, erfolgte die Untersuchung auf Homozygotie durch qPCR mittels der in Abbildung III-8B dargestellten Primer. T-DNA-Insertionspflanzen, für die ein PCR-Produkt unter Verwendung des T-DNA-homologen Primers P3.3 und des *SUVH2*-homologen Primers P3.1 gebildet wurde sowie kein Produkt mit den, das Wildtypallel amplifizierenden Primern P3.1 und P3.2 entstand, galten als homozygot. Alle darauf folgenden Analysen an der GABI-KAT T-DNA-Insertionslinie erfolgten an Tochtergenerationen homozygoter Pflanzen.

Des Weiteren wurde eine *SUVH2*-Überexpressionslinie (*SUVH2-oe*), die von der AG Prof. Dr. Reuter (MLU Halle, Institut für Genetik) zur Verfügung gestellt wurde, untersucht. Diese Linie wurde über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA-Transformation in das Genom von *Arabidopsis* generiert (Naumann et al. 2005; Naumann 2006; sowie Kapitel V.1.9). In Abbildung III-8A ist ein Teil der transformierten T-DNA gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die kodierende Sequenz unter Kontrolle des konstitutiven 35S* Promotors in Fusion mit einem *myc-His tag* exprimiert wird.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den beiden T-DNA-Insertionslinien *SUVH2-oe* und *svh2*-GK tatsächlich um *gain-of-function* bzw. *loss-of-function* Linien handelt, erfolgte die Untersuchung des Expressionsverhaltens von *SUVH2* über qRT-PCR an RNA, die 16 Tage nach Aussaat (TNA) aus Rosettenblättern von WT-, homozygoten *svh2*-GK- und heterozygoten *SUVH2-oe*-Pflanzen extrahiert wurde. Für die Analyse der *SUVH2*-Expression wurde dabei das Primerpaar, das ebenfalls in Abbildung III-8A (P2.1 und P2.2) dargestellt ist, verwendet. In Abbildung III-8C sind die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Expression für die transgenen Linien im Verhältnis

zur Expression von *SUVH2* im WT gezeigt. Für die *SUVH2*-Überexpressionslinie konnte eine im Vergleich zum WT etwa 150fach stärkere Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde für die *svh2*-GK-Linie aufgrund der nachgewiesenen homozygoten T-DNA-Insertion keine Expression von *SUVH2* erwartet. Dennoch konnten unveränderte Transkriptmengen im Vergleich zum WT detektiert werden. Erneut erfolgte die Überprüfung der *SUVH2*-Expression mit der C-terminal gelegenen Primerkombination P3.1 und P3.2 (Abb. III-8B), die für den Test auf Homozygotie verwendet wurde. Mit diesem Primerpaar konnte wiederum kein Transkript in der *svh2*-GK-Linie nachgewiesen werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass es wahrscheinlich in den *svh2*-GK-Pflanzen zur Bildung eines verkürzten Transkriptes kommt. Dieser Widerspruch sollte nachfolgend über *Northern-Blot*-Analysen aufgeklärt werden. Im Gegensatz zur Expressionsanalyse über qRT-PCR ermöglicht die *Northern*-Analyse neben der quantitativen Bestimmung auch die Detektion der Gesamtlänge eines Transkriptes. So sollte überprüft werden, ob in der *svh2*-GK-Linie tatsächlich zur Bildung eines verkürzten *SUVH2*-Transkriptes kommt. Da *SUVH2* im WT nur sehr schwach exprimiert wird, erfolgte dazu zunächst eine Aufreinigung und Anreicherung der mRNA (s. Kapitel V.2.5.6.1). Jeweils 1,35 µg mRNA wurden aus Blättern des WTs, der *svh2*-GK-Linie sowie der Überexpressionslinie *SUVH2*-oe extrahiert und für die *Northern*-Analysen verwendet. Dabei wurde eine 475 bp große Digoxigenin-markierte Sonde, die homolog zur *SUVH2* mRNA ist, verwendet (s. Kapitel V.2.5.7.1). In Abbildung III-8C ist deutlich die 2424 bp lange Bande des *SUVH2*-Transkriptes für den WT erkennbar. Für die *SUVH2*-oe-Linie konnte erneut ein deutlich erhöhter Transkriptgehalt nachgewiesen werden. Da in dieser Linie *SUVH2* in Fusion mit einem dreifachen *myc tag* exprimiert wird, ist das detektierte Transkript entsprechend größer als das WT-Transkript. Weiterhin zeigten die *Northern*-Analysen, dass es tatsächlich zur Bildung eines verkürzten *SUVH2*-Transkriptes in der Linie *svh2*-GK kommt. Daraufhin sollte die Verteilung des *SUVH2*-Proteins in Kernen vom WT und der transgenen Linien überprüft werden. Dazu wurden immunozytologische Untersuchungen unter Verwendung eines *SUVH2*-spezifischen Antikörpers (α -*SUVH2*; polyklonal) durchgeführt (s. Kapitel V.2.5.11.2). Abbildung III-8D zeigt die entsprechenden Fluoreszenzsignale der Immunozytologie sowie die korrespondierende DAPI-Färbung repräsentativer Kerne des WTs, der *SUVH2*-oe-Linie sowie der *svh2*-GK-Linie. Für den WT ist deutlich die bekannte dominante Assoziation des *SUVH2*-Proteins mit den heterochromatischen Bereichen der Chromozentren zu erkennen (Naumann et al. 2005; Ay et al. 2014b). Die distinkte Lokalisation des Proteins ist völlig verändert in Kernen der *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen. Hier scheint das Protein ubiquitär über den gesamten Bereich des Zellkerns verteilt zu sein. Weiterhin konnte für die *svh2*-GK-Linie über den *SUVH2*-spezifischen Antikörper keinerlei Fluoreszenz detektiert werden. Dies spricht für eine völlige oder zumindest stark dezimierte Expression des *SUVH2*-Proteins. So kommt es zwar zur Bildung eines verkürzten Transkriptes, jedoch nicht zur Expression eines Proteins oder aber zu einem schnellen Abbau des translatierten Proteins.

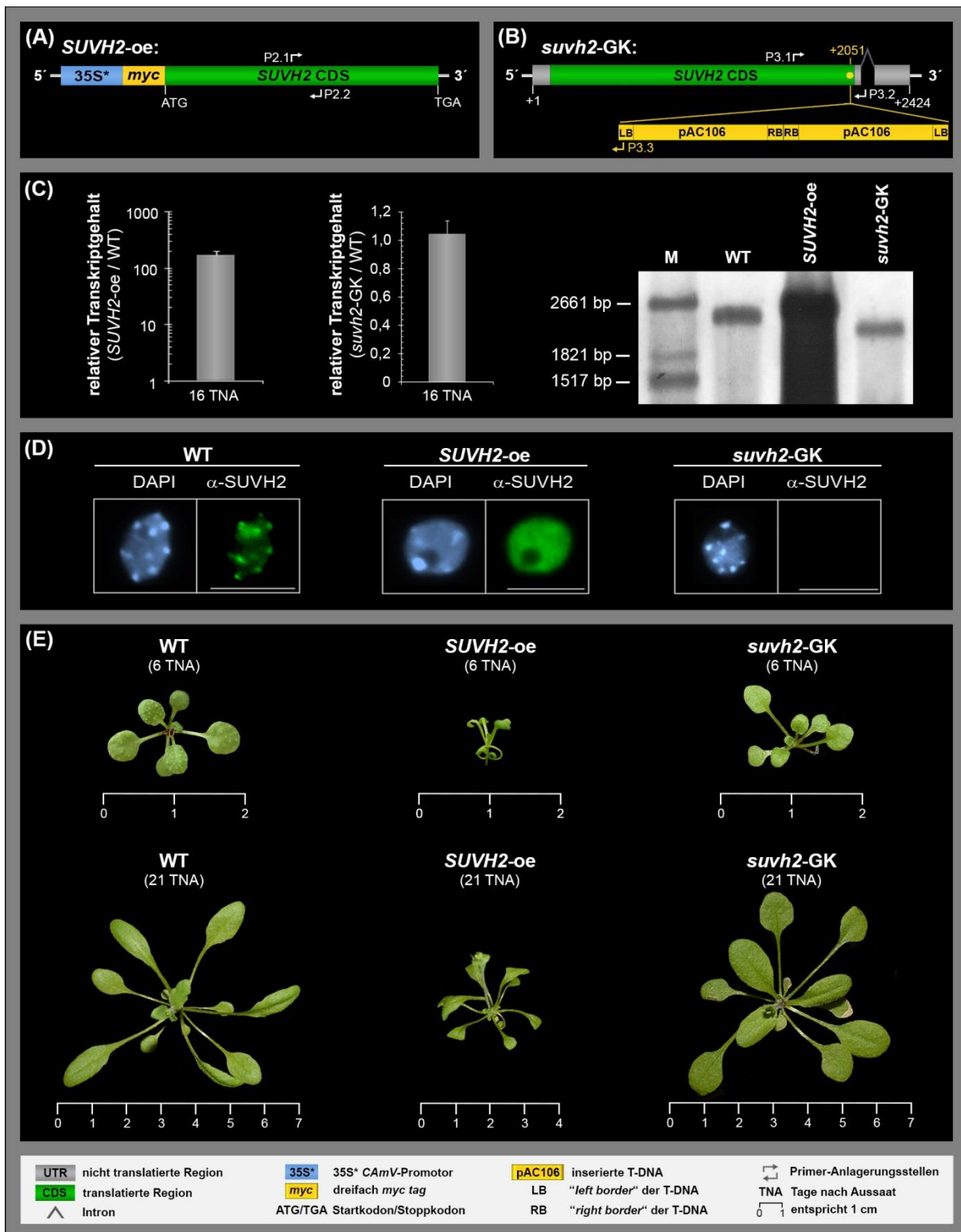


Abbildung III-8: Charakterisierung der SUVH2-Überexpressionslinie (SUVH2-oe) sowie der T-DNA-Insertionslinie GABI-KAT_516A07 (suvh2-GK). (A) Gezeigt ist die schematische Darstellung der untersuchten SUVH2-Überexpressionslinie (SUVH2-oe). Das Überexpressionskonstrukt setzt sich aus einem dreifachen myc tag sowie der SUVH2 CDS zusammen und steht unter der Kontrolle des 35S* *CamV*-Promotors. (B) Grafische Darstellung der Genstruktur der SUVH2 T-DNA Mutante (suvh2-GK). Die Linie enthält zwei Kopien der T-DNA pAC161 (inverse Duplikation), die 1937 bp nach dem Start-ATG, bzw. 2051 bp nach dem TKS innerhalb der SET-Domäne von SUVH2 (AT2G33290), inseriert ist. Die T-DNA ist jeweils von der left border (LB)-Sequenz bzw. der right border (RB)-Sequenz flankiert. Primer: P3.1 = genomischer forward Primer; P3.2 = genomischer reverse Primer; P3.3 = Insert-Primer (T-DNA-Primer: GK_LB_o8409, der sich an der LB der T-DNA anlagert) (C) Analyse der SUVH2-Expression in der SUVH2-oe-Linie (links) sowie in der suvh2-GK-Linie (Mitte) mittels qRT-PCR erfolgte unter Verwendung der in Abb.III-8A/B dargestellten Primerkombinationen P2.1+P2.2 für sowie P3.1+P3.2. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der 18S rRNA anhand der 2^{- $\Delta\Delta$ CT}-Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2). Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung (graue dünne Fehlerbalken). (rechts) Ergebnis der mRNA-Northern-Blot-Analyse unter Verwendung einer Digoxigenin-markierten SUVH2-Sonde (s. Kapitel V.2.5.7.1) für den WT, SUVH2-oe und suvh2-GK. Die

RNA wurde aus ganzen Rosetten von Pflanzen 16 Tage nach Aussaat (TNA) extrahiert. (D) Gezeigt sind die Immunofluoreszenzbilder repräsentativer Interphasekerne aus Rosettenblättern unter Verwendung eines SUVH2-spezifischen Antikörpers (α -SUVH2) für den WT, *SUVH2*-oe sowie *suvh2*-GK. Jeweils links sind die DAPI-Fluoreszenz und jeweils rechts die Immunofluoreszenz zu erkennen. Es ist jeweils ein Größenstandard = 10 μ m als dünne weiße Linie gegeben. (E) Repräsentative Arabidopsisrosetten von WT-, heterozygoter *SUVH2*-oe- sowie *suvh2*-GK-Pflanzen sechs bzw. 21 TNA.

Demnach kann man davon ausgehen, dass es sich bei der *suvh2*-GK-Linie zumindest um eine starke *knockdown*-Linie handelt und die Funktion des SUVH2-Proteins weitestgehend nicht mehr erfüllt werden kann. Im Fortgang der Arbeit sollten die transgenen Pflanzen hinsichtlich ihres allgemeinen Phänotyps untersucht werden. Repräsentative Pflanzen des WTs sowie der beiden transgenen Linien wurden nach sechs und 21 TNA fotografisch dokumentiert und sind in Abbildung III-8E gezeigt. Für die *SUVH2*-oe-Linie sind die bereits bekannten phänotypischen Veränderungen wie gekräuselte Blattränder (*curled leaves*), insbesondere der Kotyledonen sowie ein deutlicher Kleinwuchs (Naumann et al. 2005) auffällig. Zudem wurden ebenfalls bekannte Charakteristika wie eine verringerte Schotenausbildung sowie eine reduzierte Fertilität im Vergleich zum WT festgestellt (Daten nicht gezeigt). Alle beschriebenen phänotypischen Charakteristika waren dabei in homozygoten *SUVH2*-oe-Pflanzen stärker ausgeprägt als in heterozygoten Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Auf Grund des extrem starken Kleinwuchses der homozygoten *SUVH2*-Überexpressionspflanzen erfolgten die physiologischen und molekularen Analysen an heterozygoten Pflanzen. Im Gegensatz zur *SUVH2*-oe Linie, weist die *suvh2*-GK-Linie keine Unterschiede in der Morphologie der Kotyledonen oder im allgemeinen Pflanzenwuchs auf. Auch andere phänotypische Charakteristika wie Veränderungen in der Schotenausbildung oder der Fertilität waren hier unauffällig im Vergleich zum WT (Daten nicht gezeigt). Für beide transgene Linien wurden zudem unter den getesteten Langtagbedingungen keine Veränderungen des Blühzeitpunktes oder dem Ausbildungsbeginn der Rosettenblätter bis zum Blühbeginn im Vergleich zum WT festgestellt (Daten nicht gezeigt).

III.4.2.2 Untersuchungen des Seneszenzverlaufs der transgenen Pflanzen.

Neben der allgemeinen phänotypischen Analyse wurde insbesondere der Verlauf der Blattseneszenz im definierten System (s. Kapitel III.1.1) der beiden transgenen Linien *suvh2*-GK und *SUVH2*-oe untersucht. Wie in Abb. III-1 gezeigt, stellen physiologische Messungen wie die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz oder des Chlorophyllgehalts geeignete Werkzeuge dar, den Seneszenzverlauf an Blättern zu dokumentieren. Daher erfolgte die genaue Betrachtung sowohl der *suvh2*-GK-Linie als auch der *SUVH2*-oe-Linie hinsichtlich der physiologischen Blattalterung im Vergleich zum WT.

III.4.2.2.1 Phänotypisierung des Seneszenzverlaufs von *suvh2*-GK-Pflanzen.

Die *SUVH2* *knockdown*-Linie *suvh2*-GK wurde im Vergleich zum WT anhand einer Seneszenzkinetik über etwa sieben Wochen nach Aussaat in drei biologischen Replikaten hinsichtlich des Seneszenzverlaufs untersucht. Abbildung III-9A zeigt repräsentative Blattrosetten

von Pflanzen der *svh2*-GK-Linie sowie des WT's etwa zwei bzw. sechs Wochen nach Aussaat. Weiterhin sind repräsentative Exemplare der Rosettenblätter fünf bis acht für die über den Verlauf des WT's definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1 und S2 abgebildet.

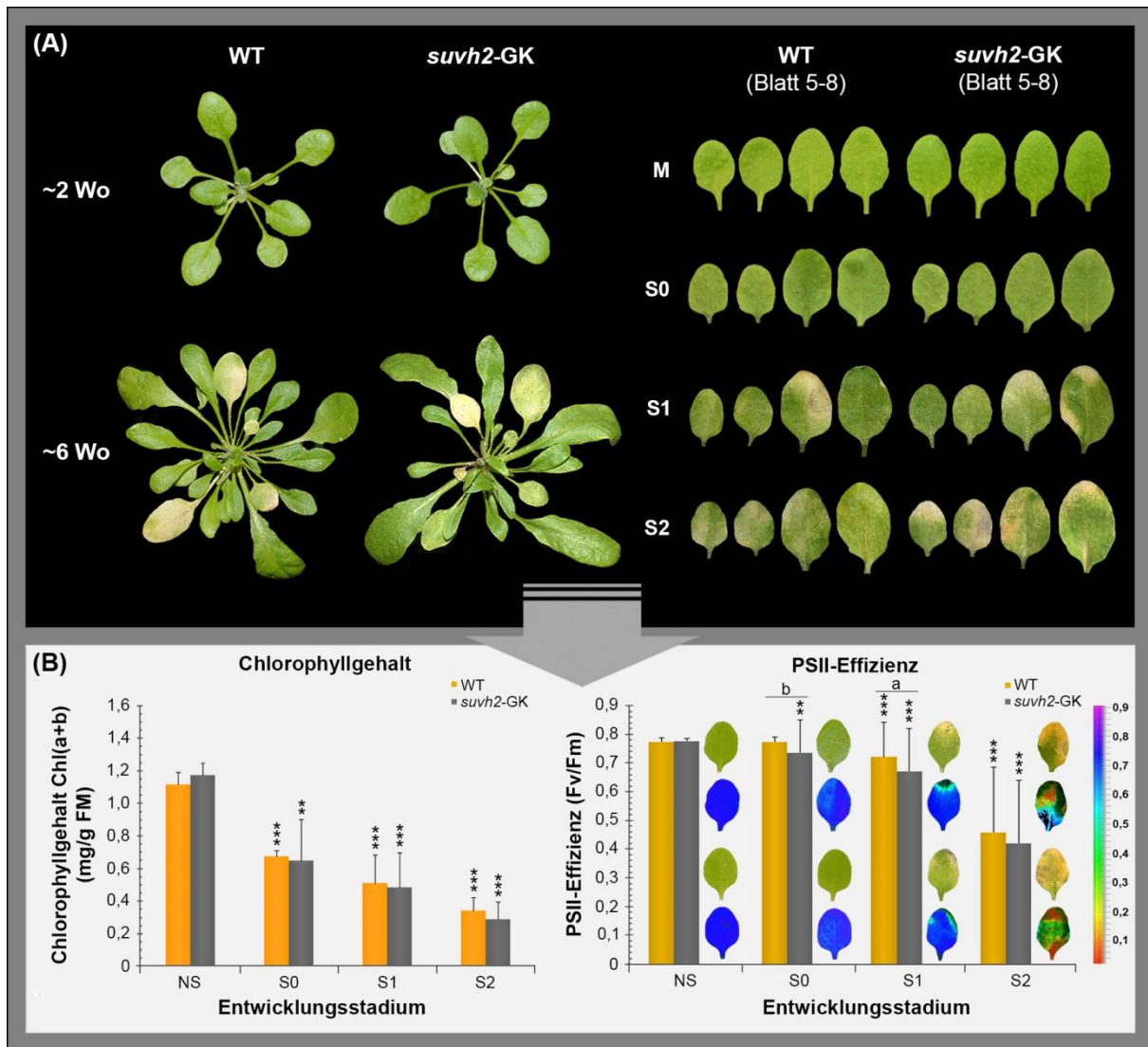


Abbildung III-9: Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung der *svh2*-GK-Linie im Vergleich zum WT. (A) Linke Seite: Fotografische Dokumentation der Entwicklung von repräsentativen Arabidopsisrosetten des WT's und der *svh2*-GK-Linie nach zwei bzw. sechs Wochen (Wo). Rechte Seite: Fotografische Dokumentation repräsentativer Rosettenblätter (fünf bis acht) des WT's sowie der *svh2*-GK-Linie zu den definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1 und S2. (B) Gezeigt sind die Veränderungen des Chlorophyllgehaltes (linke Seite) bzw. der PSII-Effizienz (F_v/F_m = maximale Quantenausbeute von PSII; rechte Seite) in Abhängigkeit von den definierten Seneszenzstadien. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert (mit entsprechender Standardabweichung als dünne Fehlerbalken dargestellt) von je fünf bis zehn Messungen und vier biologischen Replikaten. Zudem sind repräsentative Bilder von Blatt sechs sowie entsprechende Fehlfarbenbilder der Imaging-Pam-Analyse für den WT (oberen zwei Reihen) sowie die *svh2*-GK-Linie (unteren zwei Reihen) gezeigt. Der entsprechende Maßstab ist am rechten Bildrand zur Orientierung gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student-t*-Test) sind durch Sternchen bzw. durch Kleinbuchstaben markiert $p < 0,05$ (*; a), $p < 0,01$ (**; b), $p < 0,001$ (***). Die Sternchen kennzeichnen Signifikanzlevel zwischen den verschiedenen Seneszenzstadien in Bezug auf das Kontrollstadium (NS) im WT oder entsprechend in der *svh2*-GK-Linie. Kleine Buchstaben kennzeichnen dagegen entsprechend Signifikanzlevel im Vergleich eines Stadiums der *svh2*-GK-Linie bezogen auf den WT.

Die fotografische Dokumentation der Rosetten sowie der Blätter fünf bis acht zeigte keine deutlichen Unterschiede der Blattalterung zwischen den WT- und den *svh2*-GK-Pflanzen. Dennoch erfolgte der genaue Vergleich der physiologischen Blattalterung über die Bestimmung des relativen Chlorophyllgehalts sowie der PSII-Effizienz (Abb. III-9B). Betrachtet man den

Verlauf des Chlorophyllgehaltes in der *svh2*-GK-Linie, sind keine signifikanten Unterschiede zum WT erkennbar. Auch der Verlauf der PSII-Effizienz in den untersuchten Stadien ist ähnlich zueinander. Einzig in den frühen Phasen der Seneszenz (S0 und S1) konnten zwar signifikante, jedoch nur sehr geringe Unterschiede festgestellt werden.

Zusammenfassend lassen die phänotypische Untersuchung der T-DNA-Insertionslinie *svh2*-GK den Schluss zu, dass der Verlust des SUVH2-Proteins zu keinem deutlich veränderten Seneszenzverlauf im Vergleich zum WT führt.

III.4.2.2.2 Phänotypisierung des Seneszenzverlaufs von SUVH2 überexprimierenden Pflanzen.

Neben der *svh2*-GK-Linie wurde auch der Seneszenzverlauf der SUVH2-Überexpressionslinie *SUVH2*-oe mit dem des WT verglichen. Abbildung III-10A zeigt jeweils repräsentative Blattrosetten von Pflanzen der *SUVH2*-oe-Linie sowie des WTs etwa zwei bzw. sechs Wochen nach Aussaat. Des Weiteren sind Blatt fünf bis acht repräsentativer Rosetten für die über den Verlauf des WTs definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1 und S2 abgebildet. Die fotografische Dokumentation der Rosetten und der Blätter fünf bis acht zeigt einen deutlich veränderten Verlauf der Blattalterung in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen, unabhängig von einer Verschiebung der Blühinduktion. Sowohl die Betrachtung der gesamten Rosetten als auch der gesondert analysierten Blätter fünf bis acht zeigen ein deutlich späteres Einsetzen des seneszenztypischen Ausbleichens. Auch für die *SUVH2*-oe-Linie wurde der Seneszenzverlauf für die Blätter fünf bis acht über die physiologischen Marker Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz im Vergleich zum WT genauer analysiert (Abb. III-10B). Für beide Parameter wurden signifikante Unterschiede zwischen der *SUVH2*-oe-Linie und dem WT in den untersuchten Seneszenzstadien festgestellt. So verringern sich sowohl der Chlorophyllgehalt als auch die PSII-Effizienzen in der *SUVH2*-Überexpressionslinie im Vergleich zum WT deutlich später. Die Blätter der *SUVH2*-oe-Linie erreichen im Durchschnitt um *circa* eine Woche verzögert das physiologische Alter des WTs im S2-Stadium. Zu diesem Zeitpunkt waren die Blätter fünf bis acht bei den meisten WT-Pflanzen bereits vollständig vergilbt und es konnte keine PSII-Effizienz mehr bestimmt werden. Dieses Stadium, bei dem die Blätter fünf bis acht der *SUVH2*-oe-Linie physiologisch dem S2-Stadium des WTs entsprachen, wurde als viertes Seneszenzstadium (S3) für die Überexpressionslinie definiert. Über Expressionsanalysen mittels qRT-PCR wurde außerdem die Stärke der Überexpression von *SUVH2* in den vier Seneszenzstadien im Vergleich zur Expression im WT analysiert. Wie in Abbildung III-11 zu erkennen, wird in allen untersuchten Stadien (NS, S0, S1 und S2) deutlich mehr *SUVH2*-Transkript gebildet als im WT. Weiterhin wurde ein Anstieg des relativen Transkriptgehaltes bereits im S1-Stadium und noch deutlicher im S2 Stadium detektiert. Im S2-Stadium wurde bezogen auf den WT etwa 600-mal mehr Transkript als im NS-Stadium detektiert. Dies begründet sich teilweise im Absinken der *SUVH2*-Expression im WT während der Seneszenz

(s. Kapitel III.4.1, Abb. III-7D). Jedoch erklärt dies nur zum Teil den deutlichen Anstieg der Expression von *SUVH2*. So scheint aus bislang nicht bekannten Gründen die Aktivität des 35S*-Promotors während der Seneszenz zu steigen.

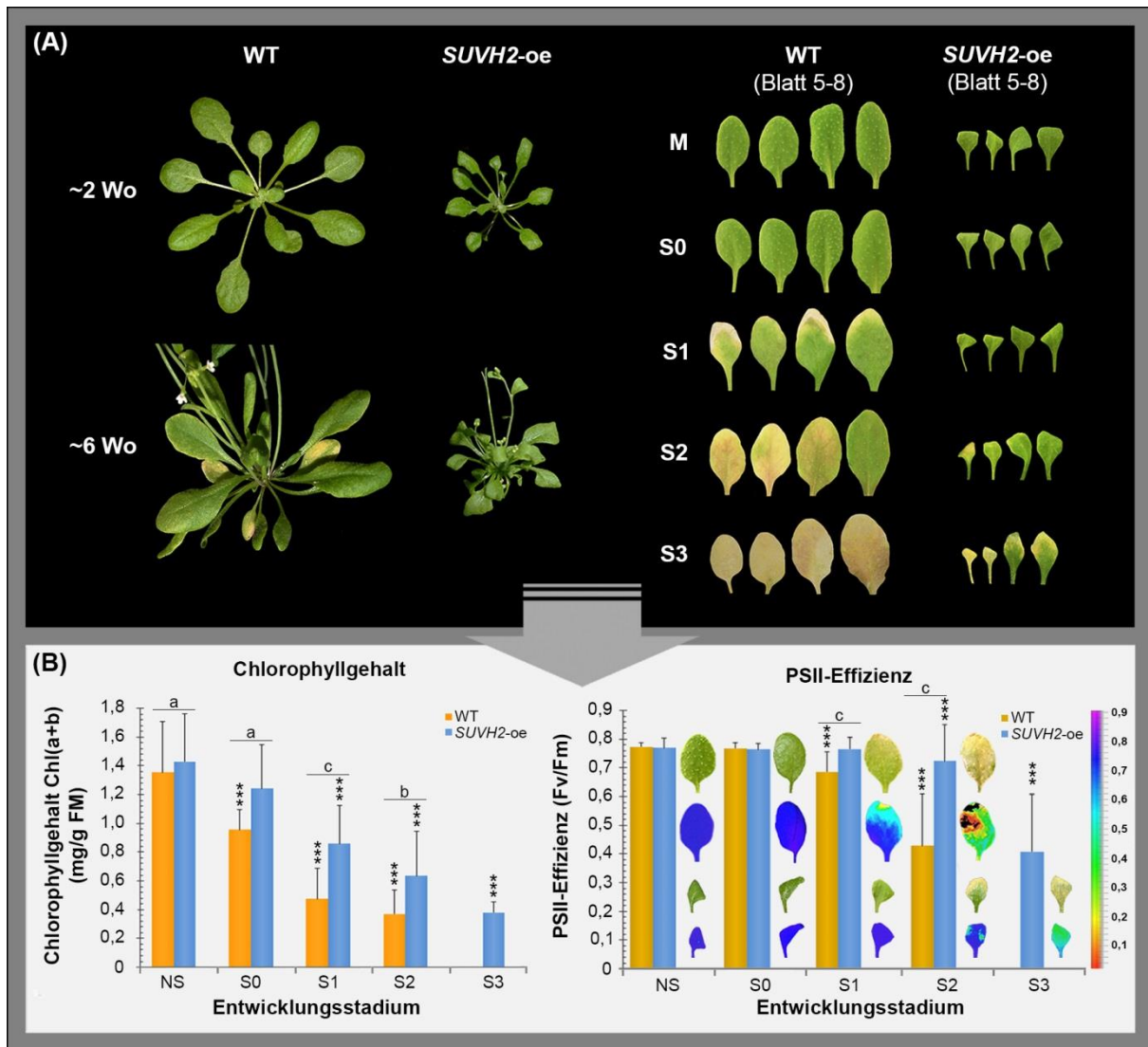


Abbildung III-10: Verlauf der Blattseneszenz von Arabidopsis-Rosettenblättern und die physiologische Charakterisierung der *SUVH2-oe*-Linie im Vergleich zum WT. (A) Linke Seite: Fotografische Dokumentation der Entwicklung von repräsentativen Arabidopsisrosetten des WT und der *SUVH2-oe*-Linie nach zwei und sechs Wochen (Wo). Rechte Seite: Fotografische Dokumentation repräsentativer Rosettenblätter (fünf bis acht) zu den definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 des WT sowie der *SUVH2-oe*-Linie. (B) Gezeigt sind die Veränderungen des Chlorophyllgehaltes (linke Seite) bzw. der PSII-Effizienz (F_v/F_m = maximale Quantenausbeute von PSII; rechte Seite) in Abhängigkeit von den definierten Seneszenzstadien. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert (mit entsprechender Standardabweichung als dünne Fehlerbalken dargestellt) von je fünf bis zehn Messungen und vier biologischen Replikaten. Zudem sind repräsentative Bilder von Blatt sechs sowie entsprechende Fehlfarbenbilder der Imaging-Pam-Analyse für den WT (oberen zwei Reihen) sowie *SUVH2-oe* (unteren zwei Reihen) gezeigt. Der entsprechende Maßstab ist am rechten Bildrand zur Orientierung dargestellt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) sind durch Sternchen oder durch Kleinbuchstaben markiert $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***); c). Die Sternchen kennzeichnen Signifikanzlevel zwischen den verschiedenen Seneszenzstadien in Bezug auf das Kontrollstadium (NS) im WT oder entsprechend in der *SUVH2-oe*-Linie. Kleine Buchstaben kennzeichnen dagegen entsprechend Signifikanzlevel im Vergleich eines Stadiums der *SUVH2-oe*-Linie bezogen auf den WT.

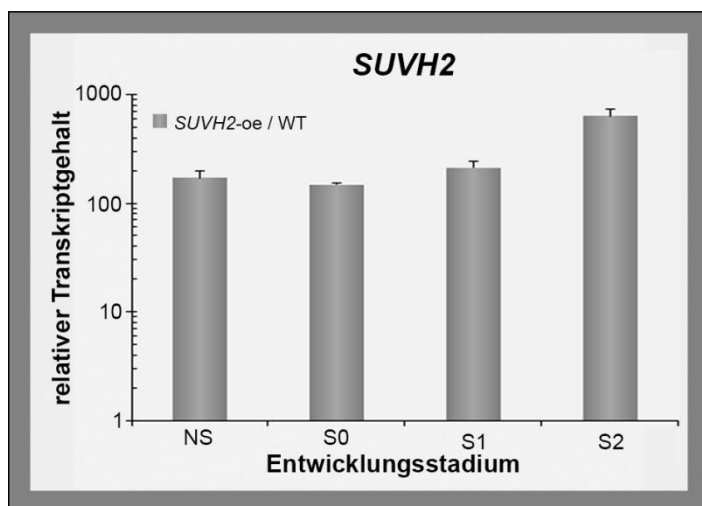


Abbildung III-11: Analysen der SUVH2-Expression in SUVH2-oe bezogen auf den WT in der Seneszenzkinetik. Gezeigt ist der relative Transkriptgehalt von SUVH2 für die Entwicklungsstadien NS, S0, S1 und S2, die über qRT-PCR in der SUVH2-oe-Linie bezogen auf den WT ermittelt wurden (verwendetes Primerpaar: P2.1+P2.2 s. Abb. III-8A). Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der 18S rRNA anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2). Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung (dunkelgraue dünne Fehlerbalken). Die Expressionsdaten sind logarithmisch aufgetragen.

Insgesamt konnte eine deutliche Verzögerung des Verlaufs der Blattseneszenz für SUVH2 überexprimierende Pflanzen gezeigt werden. Dies bestätigt die Vorversuche, die in einem groben Seneszenzscreening (s. Kapitel III.4) durchgeführt wurden. Da auf physiologischer Ebene kein veränderter Seneszenzverlauf für die SUVH2-knockdown-Pflanzen festgestellt wurde, erfolgten die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit der SUVH2-Überexpressionslinie.

III.4.3 Expressionsverhalten von Seneszenzmarkergenen in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob und wie die Überexpression von SUVH2 die seneszenzabhängige Genexpression beeinflusst. Dazu wurde zunächst die Expression der zehn Seneszenzmarkergene (s. Kapitel III.1.2) in den fünf definierten Entwicklungsstadien (NS, S0, S1, S2 und S3) mittels qRT-PCR analysiert.

III.4.3.1 Expressionsverhalten von SAG-Markergenen in der SUVH2-oe-Linie.

In Abbildung III-12 sind die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Transkriptgehalte für die SUVH2-oe-Linie (blaue Balken) sowie zur besseren Vergleichbarkeit erneut für den WT (dunkelgraue Balken) für die acht SAGs (*ANAC019*, *ANAC083*, *WRKY6*, *WRKY53*, *MYB13*, *MYB90*, *SAG12*, *FRK1*) für das nicht seneszente Kontrollstadium (NS) sowie die vier Seneszenzstadien S0, S1, S2 und S3 gezeigt. Für alle der acht analysierten SAGs, ist ein mehr oder weniger stark verändertes Expressionsverhalten in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zum WT zu erkennen. Dabei kommt es bei allen untersuchten Genen zu einem gebremsten oder sogar gänzlich unterdrückten Anstieg der Expression während der Seneszenz. So zeigen *SAG12*, *FRK1* sowie die für TF kodierenden Gene *ANAC019*, *WRKY53*, *MYB13*, *MYB90* eine sehr starke Suppression der Induktion während der Seneszenz. Insbesondere die Induktion der Expression für *WRKY53* und *FRK1* ist auch in fortgeschrittenen Seneszenzstadien (S2 und S3) weitestgehend unterdrückt.

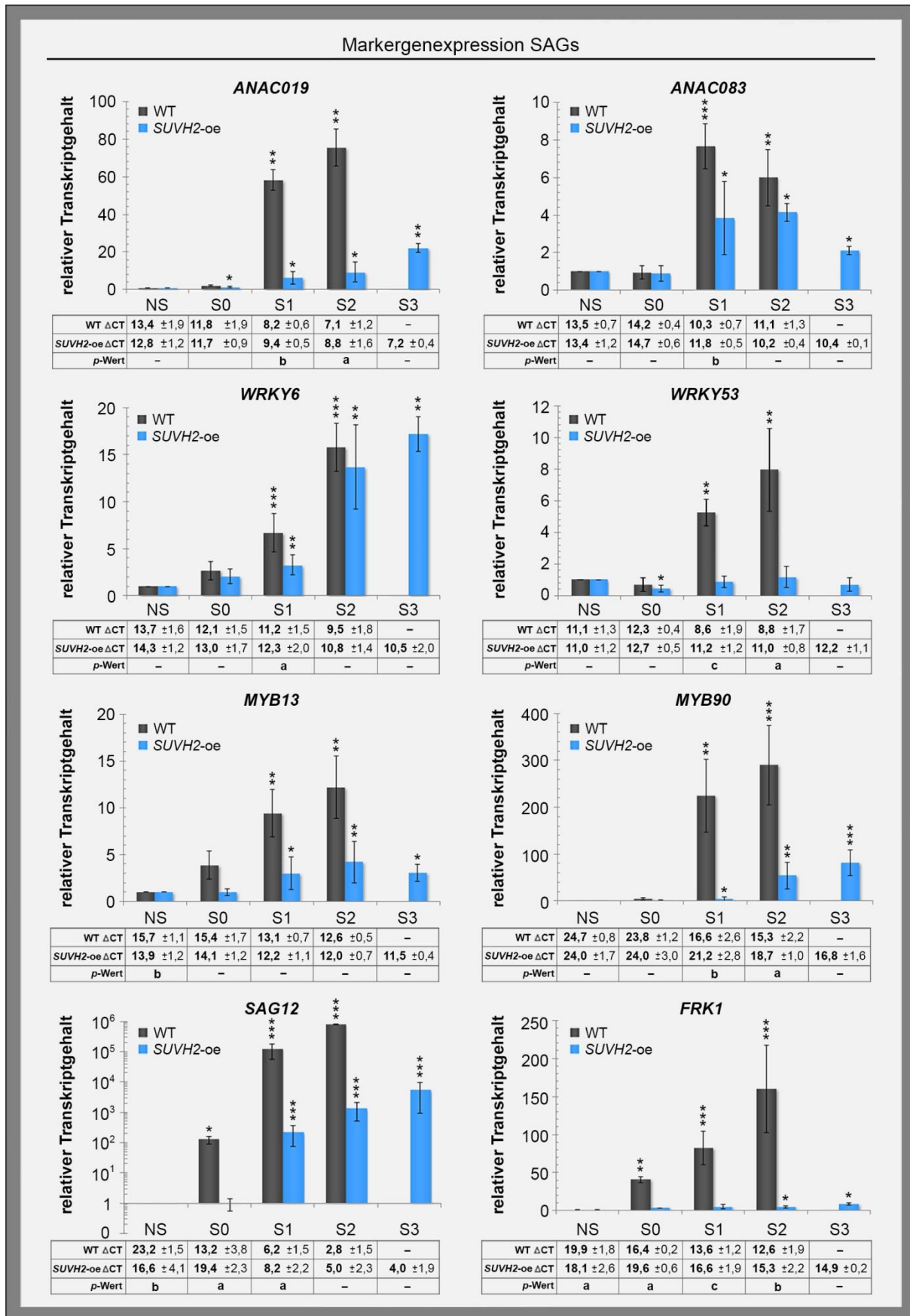


Abbildung III-12: Expression von SAG-Markergenen im definierten Seneszenzsystem für den WT und die SUVH2-oe-Linie. Bestimmung der relativen Transkriptgehalte mittels qRT-PCR für den WT und die SUVH2-oe-Linie in den drei (WT) bzw. vier (SUVH2-oe) definierten Seneszenzstadien S0, S1, S2 und S3, bezogen auf die basalen Transkriptgehalte in der nicht seneszenten Kontrolle (NS), die gleich eins gesetzt wurden. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der 18S rRNA nach der der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.3). Die Daten zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung als dünne Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Student t-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS)

sind durch Sternchen markiert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Für jedes Gen sind zudem die Mittelwerte der ΔCT -Werte mit entsprechender Standardabweichung tabellarisch für jedes einzelne Stadium für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet [$p < 0,05$ (a), $p < 0,01$ (b), $p < 0,001$ (c)].

Im Vergleich dazu wurde für *WRKY6* und *ANAC083* nur ein leicht verändertes Expressionsverhalten detektiert. Des Weiteren ergab die Betrachtung der basalen Expression im nicht seneszenten Kontrollstadium (NS) für die *SUVH2*-Überexpressionslinie im Vergleich zum WT signifikante Unterschiede für die Gene *SAG12*, *FRK1* und *MYB13*. Wie an den Mittelwerten der ΔCT -Werte, die für das NS-Stadium des WT sowie der *SUVH2*-oe-Linie bestimmt wurden, zu erkennen ist, sind die Transkriptgehalte in diesem Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie bereits deutlich höher als im WT. Demnach ist die seneszenzabhängige Induktion zwar kleiner als im WT, allerdings ist dies im Falle dieser Gene vor allem in einem höheren Ausgangslevel der Transkriptmenge begründet. Für die restlichen fünf untersuchten SAGs wurden keine Unterschiede der Expression im NS-Stadium im Vergleich zum WT detektiert.

III.4.3.2 Expressionsverhalten von SDG-Markergenen in der *SUVH2*-oe-Linie.

Weiterhin wurde das Expressionsverhalten der beiden SDGs *RBCS* und *RPS17* in der *SUVH2*-oe-Linie analysiert. In Abbildung III-13 sind die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Transkriptgehalte für die *SUVH2*-oe-Linie (blaue Balken) sowie zur besseren Vergleichbarkeit erneut für den WT (dunkelgraue Balken) für das nicht seneszente Kontrollstadium (NS) sowie die vier Seneszenzstadien S0, S1, S2 und S3 gezeigt.

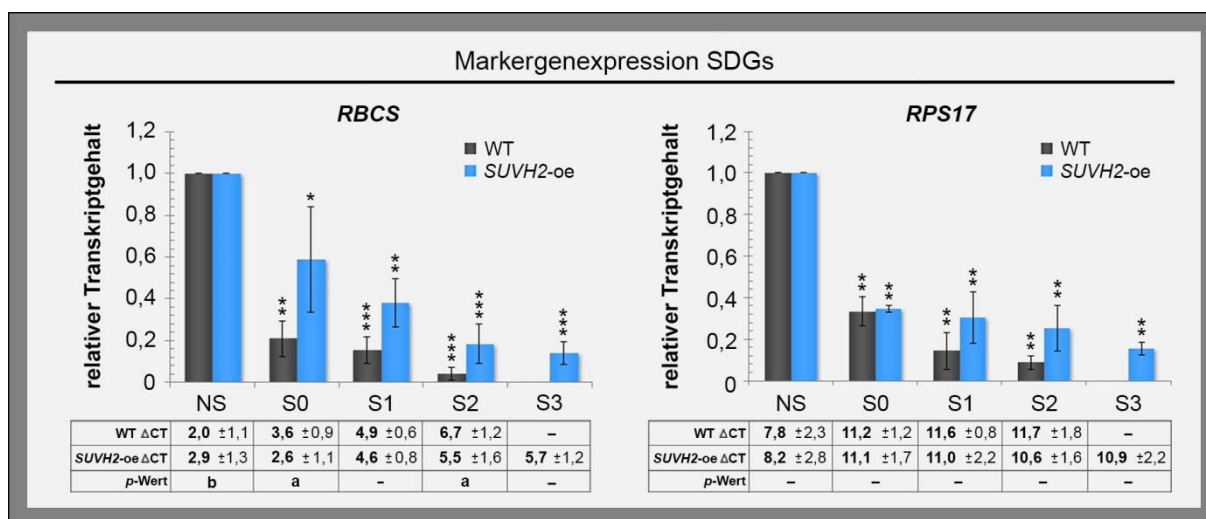


Abbildung III-13: Expression von SDG-Markergenen im definierten Seneszenzsystem für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie. Bestimmung der relativen Transkriptgehalte mittels qRT-PCR für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie in den drei (WT) bzw. vier (*SUVH2*-oe) definierten Seneszenzstadien S0, S1, S2 und S3, bezogen auf die Transkriptgehalte in der nicht seneszenten Kontrolle (NS), die gleich eins gesetzt wurden. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der *18S* rRNA nach der der $2^{-\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.3). Die Daten zeigen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung als dünne Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) sind durch Sternchen markiert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Für jedes Gen sind zudem die Mittelwerte der ΔCT -Werte mit entsprechender Standardabweichung tabellarisch für jedes einzelne Stadium für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet [$p < 0,05$ (a), $p < 0,01$ (b)].

Im Gegensatz zu den SAGs zeigen die beiden untersuchten SDGs kaum oder nur leichte Veränderungen ihres seneszenzabhängigen Expressionsverhaltens. Insbesondere die Expression von *RPS17* zeigt keine Beeinflussung der Repression während der Seneszenz durch die Überexpression von *SUVH2*. Auch *RBCS* wird bereits in der frühen Phase der Seneszenz (S0-Stadium) sowohl im WT als auch in der *SUVH2*-Überexpressionslinie herunterreguliert. Allerdings verläuft diese Repression erkennbar verzögert in der *SUVH2*-oe-Linie ab.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die acht untersuchten SAGs in Übereinstimmung mit der beobachteten verzögerten Seneszenz in der *SUVH2*-Überexpressionslinie nicht oder nur deutlich verzögert induziert werden. Interessanterweise ist die Expression für einen Teil dieser SAGs jedoch in nicht seneszenten Blättern der *SUVH2*-oe-Linie deutlich im Vergleich zum WT verstärkt. Die Expression der beiden untersuchten SDGs verhält sich dagegen ähnlich zum Wildtyp.

III.4.4 Untersuchungen des Chromatins in Interphasekernen *SUVH2* überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz.

Sowohl auf physiologischer als auch auf Ebene der Expression bekannter SAG- und SDG-Markergene konnte ein seneszenzverzögernder Effekt der Überexpression der putativen Histonmethyltransferase *SUVH2* gezeigt werden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Chromatinveränderungen, die sowohl auf globaler als auch lokaler Ebene während der Seneszenz für den WT festgestellt wurden (s. Kapitel III.2 und III.3) in der *SUVH2*-oe-Linie beeinflusst sind.

III.4.4.1 Globale Chromatinveränderungen während der Seneszenz in Interphasekernen der *SUVH2*-oe-Linie.

Zunächst erfolgte die Analyse der globalen Chromatinstruktur in Interphasezellkernen von Blättern der *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Innerhalb dieser Arbeit wurden dabei wie für den WT (s. Kapitel III.2) verschiedene Chromatinmodifikationen, die entweder euchromatische oder heterochromatische Regionen kennzeichnen, untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse der globalen Analysen für die mit transkriptionsaktivem Chromatin assoziierten Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3, sowie für die beiden repressiven Modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 beschrieben. Zusätzlich erfolgte die allgemeine mikroskopische Beobachtung der Chromatinstruktur hinsichtlich der Chromozentren sowie der Nukleoli für die *SUVH2*-Überexpressionslinie im Verlaufe der Blattseneszenz analog zu den Analysen im WT.

III.4.4.1.1 Verteilungsmuster euchromatischer Histonmodifizierungen in Interphasekernen *SUVH2* überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz.

Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die euchromatischen Histonmethylierungen H3K4me2 und H3K4me3 erfolgte die immunozytologische Analyse der Verteilungsmuster dieser

Chromatinmodifikationen im Verlaufe der Seneszenz für *SUVH2* überexprimierende Pflanzen. In Abbildung III-14A sind repräsentative Aufnahmen von Interphasekernen aus nicht seneszenten (NS) Blättern sowie aus seneszenten Blättern der Stadien S1, S2 und S3 gezeigt.

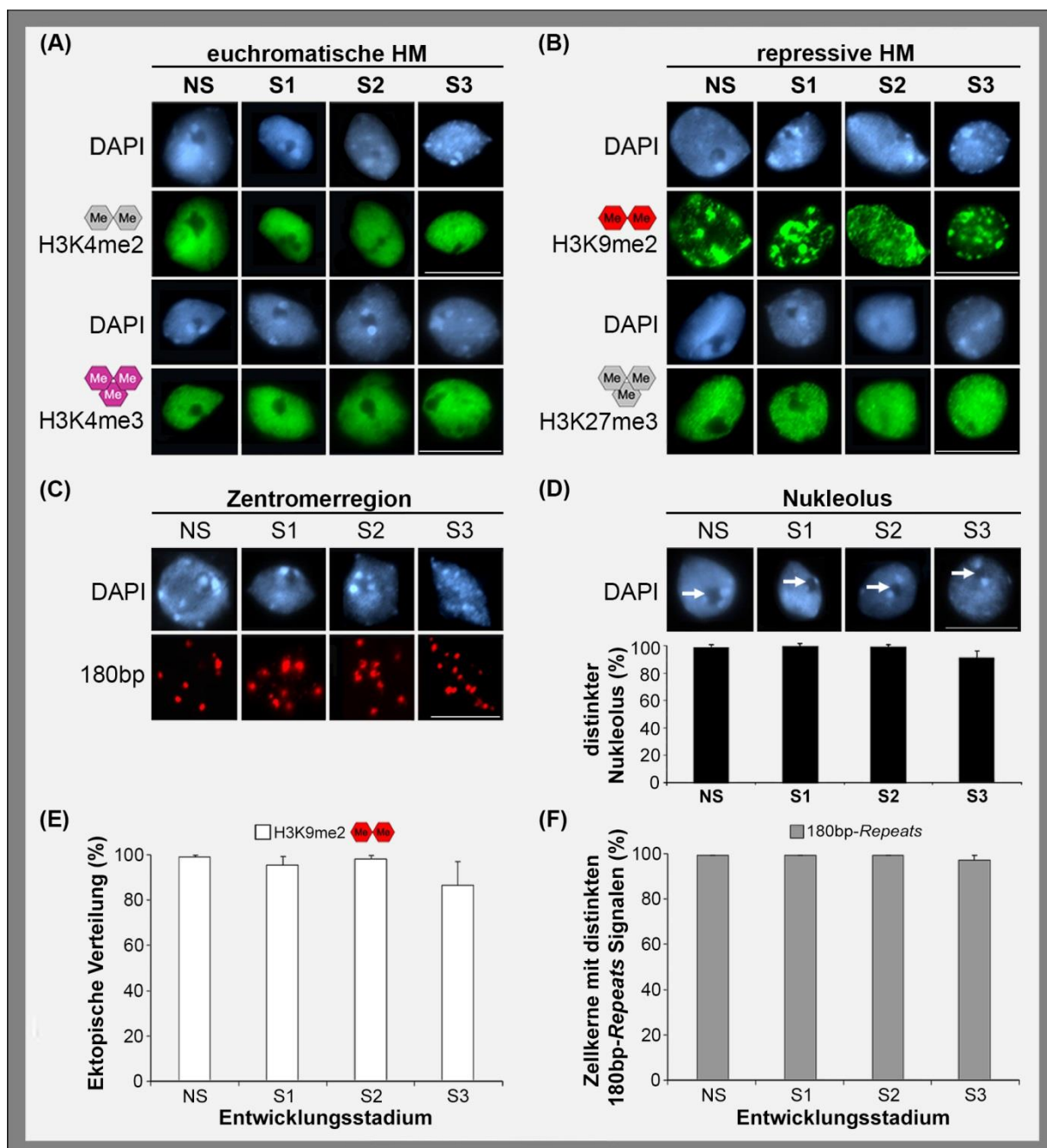


Abbildung III-14: Veränderungen der Chromatinorganisation in *SUVH2*-Überexpressionspflanzen während der Blattseneszenz. Interphasezellkerne wurden aus Arabidopsisblättern der *SUVH2*-oe-Linie (jeweils Blatt 5 oder 6) für vier verschiedene Entwicklungsstadien (NS, S1, S2 und S3) isoliert. Gezeigt sind repräsentative Kerne der immunohistochemischen Analysen der seneszenzspezifischen Veränderungen der nukleären Verteilung der euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (A) sowie der repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (B). (C) FiSH-Analysen der Veränderungen der chromatinweiten Verteilung des 180bp-Repeats (180bp; core repeat) in Interphasekernen während der Seneszenz. Für jede untersuchte Modifikation sind im oberen Teil die DAPI-Fluoreszenz und im unteren Teil die grün (immunozytologische Analysen) bzw. rot (FiSH-Analysen) dargestellte Fluoreszenz der korrespondierenden Kerne abgebildet. Es sind jeweils Größenstandards (jeweils = 10µm) als weiße dünne Linie gegeben. (D) Veränderung der Nukleoli während der Seneszenz. Oberer Teil: Gezeigt ist die DAPI-Färbung repräsentativer Interphasekerne der vier verschiedenen Entwicklungsstadien. Weiße Pfeile kennzeichnen deutlich erkennbare Nukleoli. Unterer Teil: Quantifizierung in Prozent (%) distinkt erkennbarer Nukleoli in Zellkernen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien (n ≥ 500). (E) Quantifizierung in Prozent (%) von Zellkernen mit einer ektopischen Umverteilung der H3K9me2 immunozytologischen Signale. (F) Quantifizierung in Prozent (%) von Zellkernen mit, durch das 180bp-Repeat FiSH-Signal, erkennbarer Kondensation der Chromozentren. Mindestens 100 Kerne wurden für jede Analyse und jedes

Entwicklungsstadium analysiert. Die quantifizierten Daten zeigen Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung für vier biologische Replikate.

Für beide Histonmodifikationen ist in Interphasekernen voll entwickelter Blätter (NS) der *SUVH2*-oe-Linie die gleiche uniforme Verteilung über den gesamten Zellkern erkennbar wie in WT-Interphasekernen des NS-Stadiums (s. Kapitel III.2.1). Jedoch sind im Gegensatz zum WT keine Änderungen des Verteilungsmusters erkennbar. So kommt es selbst im sehr späten S3-Stadium, bei dem auch die Blätter der *SUVH2*-oe-Linie deutlich seneszent sind, nicht zu einer mehr granuellen Strukturierung wie es bei 50-60% der Kerne im WT im korrespondierenden S2-Stadium der Fall war (s. Kapitel III.2.1).

III.4.4.1.2 Verteilungsmuster repressiver Histonmodifizierungen in Interphasekernen in *SUVH2* überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz.

Im WT wurde neben einer deutlichen Veränderung der Verteilung der H3K9me2-Immunofluoreszenz, die sukzessive Umgestaltung der Chromozentren festgestellt (s. Kapitel III.2.2 und III.2.3). Nun sollte die Struktur perizentromerischer und zentromerischer Chromatinbereiche während der Seneszenz auch in Interphasenkernen der *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen untersucht werden. Dazu erfolgten zunächst immunozytologische Analysen, um das H3K9me2-Verteilungsmuster in der *SUVH2*-oe-Linie im Verlaufe der Seneszenz zu untersuchen. In Abbildung III-14B sind Bilder repräsentativer Kerne der H3K9me2-Immunofluoreszenz-Experimente für die nicht seneszente Kontrolle (NS) sowie die drei Seneszenzstadien S1, S2 und S3 mit der korrespondierenden DAPI-Färbung dargestellt. Zunächst zeigen die DAPI- Bilder, dass die für den WT typische Struktur der Chromozentren in der *SUVH2*-oe-Linie verändert ist. So heben sich nur noch wenige Bereiche als deutlich heller und somit stärker mit DAPI gefärbt von dem restlichen Chromatin ab (Abb. III-14B). Weiterhin ist in Interphasekernen, die aus nicht seneszentem Blattmaterial der *SUVH2*-oe-Linie extrahiert wurden, die bereits beschriebene ektopische Umverteilung der H3K9me2-Modifikation (Naumann et al. 2005) erkennbar. Dabei sind deutlich flächigere und nicht mehr distinkt begrenzte H3K9me2-Immunofluoreszenzsignale beobachtbar. Darüber hinaus bleibt dieses ektopische Verteilungsmuster während der Seneszenz weiterhin bestehen und es kommt, im Gegensatz zum WT, zu keinen Veränderungen der H3K9me2-Verteilung in seneszenten Blättern der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum NS-Stadium (Abb. III-14B, E). Selbst im sehr späten S3-Stadium wurden keine Veränderungen der Immunofluoreszenzsignale detektiert. Neben der repressiven heterochromatischen H3K9me2-Modifikation erfolgte zudem die Analyse der Verteilungsmuster von H3K27me3, einer repressiven jedoch euchromatisch lokalisierten Modifikation (Abb. III-14B). Für die H3K27me3-Markierung konnte ein ähnliches Verteilungsmuster wie für die beiden anderen untersuchten euchromatischen Modifikationen H3K4me2 und H3K4me3 festgestellt werden. Auch für H3K27me3 konnten wie für H3K4me2 und H3K4me3 zudem keine Änderungen des Verteilungsmusters festgestellt werden

wie sie im WT beobachtet wurden. So kommt es selbst im sehr späten S3-Stadium, bei dem auch die Blätter der *SUVH2*-oe-Linie deutlich seneszent sind nicht zu einer mehr verstärkten Strukturierung wie es bei 50-60% der Kerne im WT im korrespondierenden S2-Stadium der Fall war (s. Kapitel III.2.1).

III.4.4.1.3 Analyse der Chromozentren in Interphasekernen *SUVH2* überexprimierender Pflanzen im Verlaufe der Seneszenz.

Analog zu den Versuchen im WT (s. Kapitel III.2.3) erfolgte im Anschluss über FiSH-Analysen die Untersuchung der Zentromerbereiche von Interphasezellkernen *SUVH2* überexprimierender Pflanzen im Fortgang der Seneszenz. Im Gegensatz zu der Untersuchung des H3K9me2-Verteilungsmusters (s. Kapitel III.4.4.1.2) sind die Signale der zentromerspezifischen 180bp-*Repeats* in Interphasekernen nicht seneszenten (NS) Blätter der *SUVH2*-oe-Linie denen des WTs entsprechend. So sind in der Regel etwa zehn distinkte Spots erkennbar, die die Zenromere im diploiden Zustand der meisten Interphasekerne kennzeichnen (Abb. III-14C). Allerdings kommt es während der Seneszenz in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen, im Gegensatz zum WT (s. Kapitel III.2.3), nicht zu einer Ausdehnung der 180bp-*Repeat*-Signale. Die Quantifizierung dieser Beobachtung (Abb. III-14F) zeigt, dass in allen untersuchten Seneszenzstadien, nahezu die Gesamtheit der analysierten Kerne ($n \geq 100$) klar definierte Spots der 180bp-*Repeat*-Signale aufweist. Demnach kommt es in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen zwar zu einer ektopischen Verteilung der heterochromatischen H3K9me2-Modifikation, jedoch nicht zu seneszenzabhängigen Veränderungen der Struktur der zentromerischen und perizentromerischen Bereiche, wie dies in WT-Pflanzen der Fall ist.

III.4.4.1.4 Nukleoli von Interphasekernen *SUVH2* überexprimierender Pflanzen während der Seneszenz.

Im Gegensatz zu dem festgestellten allmählichen Schwinden des Nukleolus in Interphasekernen des WTs während der Seneszenz (s. Kapitel III.2.4), war in fast allen analysierten Kernen ($n \geq 500$) der *SUVH2*-oe-Linie deutlich ein Nukleolus erkennbar. Lediglich im sehr späten S3-Stadium konnte in etwa 10% der Kerne kein Nukleolus mehr eindeutig zugeordnet werden (Abb. III-14D).

Zusammenfassend zeigen die immunozytologischen und FiSH Analysen, dass die seneszenzspezifische Umorganisation des Interphasenchromatins in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen unterdrückt ist. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es durch die Überexpression der putativen Histonmethyltransferase *SUVH2* auch lokal an SAGs zu einer Umprogrammierung der Chromatinstruktur während der Seneszenz kommen könnte.

III.4.4.2 Lokale Chromatinveränderungen an ausgewählten SAGs während der Seneszenz in der *SUVH2*-Überexpressionslinie.

Wie für den WT unter Kapitel III.3 beschrieben, erfolgte auch für die *SUVH2*-oe-Linie die Analyse der Chromatenumgebung für die drei ausgewählten SAGs *SAG12*, *ANAC083* und *WRKY53*. Expressionsanalysen dieser drei Gene ergaben deutliche Unterschiede für die *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT (s. Kapitel III.4.3). So zeigte sich für alle Gene eine schwächere, z.T. gänzlich unterdrückte Induktion der Expression während der Seneszenz in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen. Während *ANAC083* zwar eine signifikante Suppression insbesondere im S1-Stadium, jedoch eine lediglich verzögerte Induktion der Expression aufwies, war der seneszenzabhängige Anstieg der Expression von *WRKY53* über alle analysierten Seneszenzphasen fast vollständig reprimiert. *SAG12* hingegen zeigte ein anderes auffälliges Expressionsverhalten. Für dieses Gen konnten im Vergleich zum WT deutlich erhöhte Transkriptmengen im NS-Stadium für die *SUVH2*-oe-Linie nachgewiesen werden. Die eigentlich starke Induktion des Gens während der Seneszenz war dann wiederum schwächer in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen ausgeprägt als im WT. Dadurch erreichen die *SAG12*-mRNA-Mengen aufgrund der bereits vorhandenen Transkripte im NS-Stadium zum WT ähnliche, dennoch signifikant geringere Werte in den Seneszenzstadien (s. Kapitel III.4.3.1; Abb. III-12). Durch ChIP-Analysen sollte im Folgenden untersucht werden, ob die veränderten Expressionsmuster dieser Gene mit Änderungen der Histonmodifikationsmuster an assoziierten Histonen einhergehen oder nicht. Dazu erfolgten unter Verwendung der spezifischen Antikörper gegen die posttranslationalen Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 ChIP-Analysen an Chromatinextrakten aus Blättern der *SUVH2*-oe-Linie des nicht seneszenten Kontrollstadiums (NS) sowie aus Blättern des S1-Stadiums. Zu Beginn der Analysen für diese Arbeit erfolgte die Suche nach geeigneten Referenzgenen oder DNA-Bereichen für den WT, die stabil mit einer entsprechenden Modifikation in den zu vergleichenden Proben markiert sind (s. Kapitel III.3.1). Für die *SUVH2*-oe-Linie wurden analog zum WT die Verteilungsmuster der zu untersuchenden Histonmodifikationen an den für die Normalisierung ausgewählten Referenz-DNA-Bereichen überprüft. Im Appendix in Abbildung A-5 sind die Ergebnisse der ChIP-Versuche für alle ausgewählten Referenz-DNA-Regionen gezeigt. Insgesamt ergaben die Untersuchungen für die H3K4me2, H3K4me3 und die H3K9me2-Immunopräzipitationen kaum Unterschiede für die untersuchten Referenz-DNA-Bereiche im Vergleich zum WT (s. Appendix A.1.1; Abb. A-1). Allerdings wurden für die H3K27me3-Modifikation Veränderungen in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT detektiert. Für die Normalisierung der Zielgen-%-Input wurde nachfolgend analog zum WT vorgegangen. Wie im Kapitel III.3.1 für den WT beschrieben, erfolgte weiterhin die Analyse, ob die erhaltenen DNA-Mengen aus beiden untersuchten Stadien für die *SUVH2*-oe-Linie vergleichbar sind oder ob es zu Veränderungen während der Seneszenz kommt. Dazu wurde ebenfalls der Teil des Chromatins, der zur Generierung einer Kalibrierungskurve für die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA genutzt werden sollte,

hinsichtlich der erhaltenen CT-Werte in NS und S1 analysiert. Für alle untersuchten Amplikons konnten keine Unterschiede der CT-Werte ≥ 1 zwischen den beiden Stadien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde neben den bereits erwähnten spezifischen Antikörpern gegen N-terminale Histonmethylierungen an Histon H3 ein Antikörper gegen den nichtmodifizierten C-terminalen Teil des Histon H3 in den ChIPs mitgeführt, um Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Nukleosomendichte zu erhalten. Die Ergebnisse der IPs mit dem H3C-Antikörper für die drei zu untersuchenden SAGs sowie aller verwendeter Referenz-DNA-Regionen sind im Appendix A.4 in Abbildung A-6 dargestellt. Für die meisten der untersuchten Loci wurden keine signifikanten Veränderungen der Nukleosomendichte festgestellt. Allerdings konnte für einige Regionen ein signifikanter Anstieg der durch den H3C-Antikörper präzipitierten DNA-Menge in seneszentem Blattgewebe der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT detektiert werden.

III.4.4.2.1 Histonmodifikationsmuster an SAGs während der Seneszenz in der *SUVH2*-oe-Linie.

Nachfolgend sollten die Histonmodifikationsmuster an den drei SAGs *SAG12*, *ANAC083* und *WRKY53* untersucht werden. Die ChIP-Analysen erfolgten parallel an Chromatin, das aus reifen Blättern (NS) und aus seneszenten Blättern (S1-Stadium) der *SUVH2*-oe-Linie extrahiert wurde. Dabei erfolgte die Quantifizierung der immunpräzipitierten DNA sowie die Normalisierung der ChIP-Daten wie für den WT beschrieben (s. Kapitel V.2.5.13).

III.4.4.2.1.1 Histonmodifikationsmuster an *SAG12* in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz.

Die Ergebnisse der Assoziation von *SAG12*, mit den entweder transkriptionsaktives (H3K4me2 und H3K4me3) oder transkriptionsinaktives (H3K9me2 und H3K27me3) Chromatin markierenden Histonmethylierungen, sind in Abbildung III-15D und E zusammengefasst. Dargestellt sind die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (s. Appendix A.3 sowie Kapitel V.2.5.13) Mittelwerte von sechs biologischen Replikaten. Zudem sind wiederholend einige Hintergrundinformationen wie der Genaufbau mit entsprechender Lokalisation der verwendeten Primerpaare (Abb. III-15A) sowie die *USCS Arabidopsis Genome Browser*-Daten aus *Arabidopsis* Keimlingen (s. Kapitel III.3.2.1) für die zu untersuchenden Histonmodifikationen (Abb. III-15B) gezeigt. In Abbildung III-15C sind die relativen *SAG12*-Transkriptgehalte für das NS- und das S1-Stadium der *SUVH2*-oe-Linie denen des WT für eine bessere Vergleichbarkeit der ChIP-Daten mit den korrespondierenden Expressionsmustern gegenübergestellt. Für eine erleichterte Betrachtung und Vergleichbarkeit der Alternanzen der Histonmodifikationsmuster zwischen der *SUVH2*-oe-Linie und dem WT sind zudem in Abbildung III-16 die relativen Veränderungen während der Seneszenz für alle untersuchten Histonmodifizierungen der *SUVH2*-oe-Linie denen des WT gegenübergestellt. Für beide analysierten *SAG12*-DNA-Bereiche wurden ähnliche Mengen wie im

WT (Abb. III-4D) der euchromatischen H3K4me2-Modifikation in Chromatinextrakten reifer und seneszenten Blätter in der *SUVH2*-oe-Linie detektiert (Abb. III-15D).

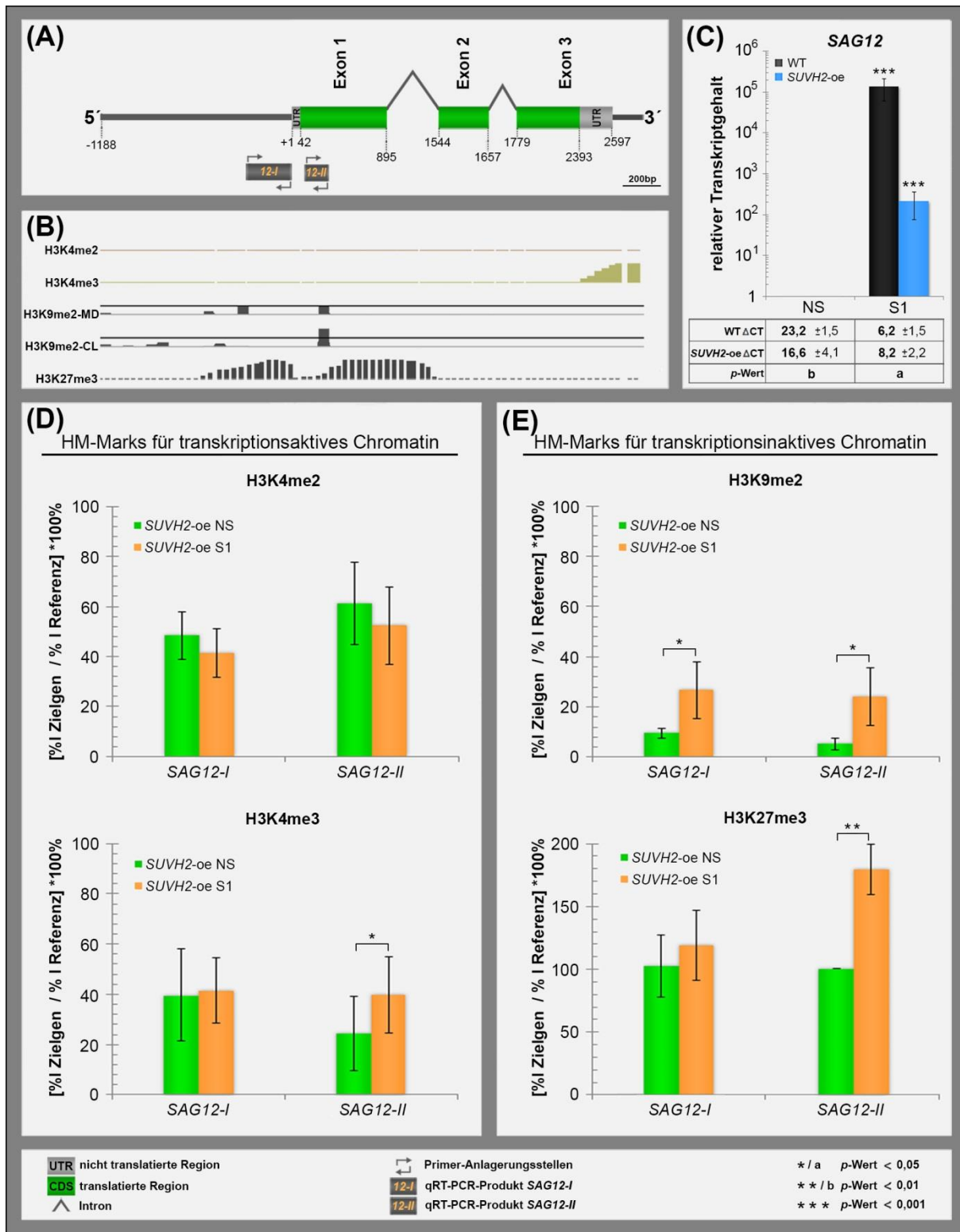


Abbildung III-15: Histonmodifikationsmuster an *SAG12* in reifem und seneszentem Blattmaterial der *SUVH2*-oe Linie. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *SAG12* (AT5G45890) sowie der etwa 1200 bp *upstream* des TKS liegende Promotorbereich. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*SAG12-I* und *SAG12-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z*-score) des *USCS Arabidopsis Genome Browsers* zu den korrespondierenden Genbereichen (unter A) für die vier untersuchten Histone Modifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Muster aus zwei Ansätzen, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren, dargestellt. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinks* und Ultraschall-behandeltem Chromatin (CL). (C) Gezeigt sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *SAG12* für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und den korrespondierenden Histone Modifikationsmustern für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie. Abgebildet sind weiterhin die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien, die unter

Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) und gegen die repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *SAG12*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) oder Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * (a) = $p < 0,05$; ** (b) = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

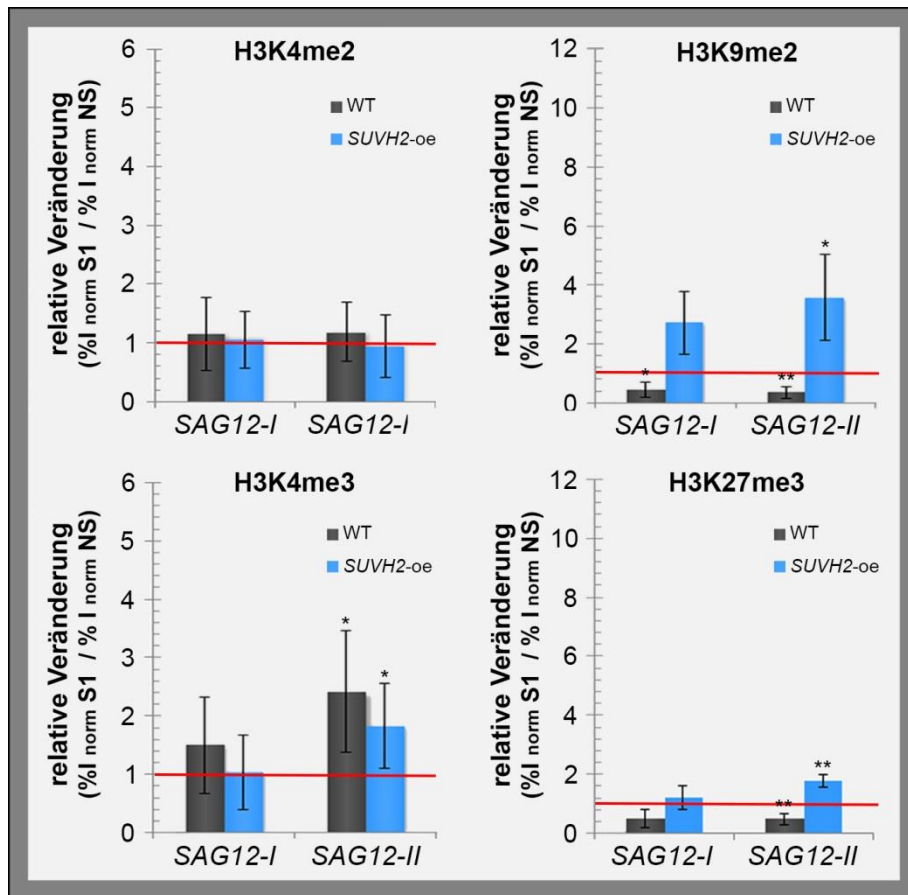


Abbildung III-16: Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an *SAG12* für den WT sowie die *SUVH2-oe*-Linie während der Seneszenz. Abgebildet sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für das NS- und das S1-Stadium, die unter Verwendung der Antikörper gegen die Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus dem Quotienten der normalisierten %-Inputwerte (%I norm) für das S1-Stadium bezogen auf die des NS-Stadiums. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Dabei kennzeichnen die dunkelgrauen Balken die Werte für den WT und die blauen Balken entsprechend für die *SUVH2-oe*-Linie. Die rote Linie markiert jeweils ein Verhältnis des Quotienten von eins, was keine Änderung der Markierung mit entsprechend modifizierten Histonen während der Seneszenz bedeuten würde. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Dabei kommt es wie im WT zu keinen Veränderungen der Assoziation der untersuchten Genbereiche mit Histonen, die diese Modifikation tragen.

Im Gegensatz zum WT, für den ein Anstieg der H3K4me3-Modifikation an beiden untersuchten Regionen von *SAG12* detektiert wurde (Abb. III-4D), kommt es in der *SUVH2-oe*-Linie nur an der *SAG12-II*-Region zu einem Anstieg der Trimethylierung von H3K4 im S1-Stadium (Abb. III-15D und III-16). Dabei ist die Höhe der %I-Werte im S1-Stadium, bezogen auf das Referenzgen *TUA4*, mit denen des WTs vergleichbar (Abb. III-4D und III-15D). Allerdings wurde in der *SUVH2-oe*-Linie bereits im NS-Stadium an der *SAG12-I*-Region mehr DNA durch die H3K4me3-Immunopräzipitation angereichert als im WT. Dies korreliert interessanterweise mit der verstärkten *SAG12*-Expression in der *SUVH2-oe*-Linie im NS-Stadium, in dem es im WT kaum nachweisbar exprimiert wird (Abb. III-15C).

Auch bei den untersuchten repressiven Histonmodifikationen ergaben sich einige Unterschiede im Vergleich zum WT (Abb. III-16). So wurde im WT für beide *SAG12*-Regionen eine signifikante Verringerung der H3K9me2-Modifikation während der Seneszenz detektiert. Im Gegensatz dazu steigt die immunopräzipitierte DNA-Menge in der *SUVH2*-oe-Linie für beide *SAG12*-Regionen signifikant an. Gleichzeitig wurde im Vergleich zum WT (Abb. III-4E) im NS-Stadium an der Region II von *SAG12* weniger und an der Region I ähnlich viel DNA durch die H3K9me2-ChIP präzipitiert (Abb. III-15E). Da es sich bei der H3K9me2-Modifikation um einen repressiven Histonmark handelt, steht die verstärkte Markierung der untersuchten *SAG12*-DNA-Bereiche im S1-Stadium zunächst im Widerspruch zu der auch in der *SUVH2*-oe-Linie deutlich erhöhten *SAG12*-Transkriptmenge. Allerdings wird *SAG12* in der *SUVH2*-oe-Linie vor allem in den frühen Seneszenzstadien S0 und S1 signifikant schwächer als im WT exprimiert, obwohl die Expression im NS-Stadium bereits deutlich höher als im korrespondierenden Stadium im WT ist (Abb. III-12). Weiterhin wurden vergleichbare Mengen DNA im NS-Stadium durch den H3K27me3-Antikörper an *SAG12* in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen (Abb. III-15E) wie im WT (Abb. III-4E) präzipitiert. Es kommt jedoch nicht wie im WT zu einem Verlust der H3K27me3-Modifikation an *SAG12*. So bleiben die %I-Werte für die Region *SAG12-I* im S1-Stadium stabil. Darüber hinaus zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg für H3K27me3 an der *SAG12-II*-Region.

Demnach kommt es in der *SUVH2*-Überexpressionslinie im S1-Stadium zu veränderten Mustern der H3K4me3- sowie der H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen im Bereich des TKSs. Dabei verstärkt sich das Vorkommen sowohl der aktivierenden H3K4me3-Modifikation als auch der repressiven H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen an *SAG12* im S1-Stadium, obwohl es auch in der *SUVH2*-oe-Linie zu einer Induktion der Genexpression kommt. Weiterhin konnte für das nicht seneszente Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT eine stärkere Markierung mit der H3K4me3-Modifikation detektiert werden. Dies korreliert wiederum mit einem erhöhten Transkriptgehalt in den nicht seneszenten Blättern der *SUVH2*-Überexpressionslinie.

III.4.4.2.1.2 Histonmodifikationsmuster an *ANAC083* in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz.

Die Ergebnisse der ChIP-Analysen für die euchromatischen H3K4me2 und H3K4me3 sowie die repressiven H3K9me2 und H3K27me3 Histonmodifikationen an den untersuchten *ANAC083*-Genbereichen sind jeweils in Abbildung III-17D und E zusammengefasst. Dargestellt sind die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (s. Appendix A.3 sowie Kapitel V.2.5.13) Mittelwerte von vier biologischen Replikaten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Histonmodifikationsmuster während der Seneszenz zwischen der *SUVH2*-oe-Linie und dem WT sind in Abbildung III-18 die relativen Veränderungen für alle untersuchten Histonmodifizierungen beider Linien gegenübergestellt.

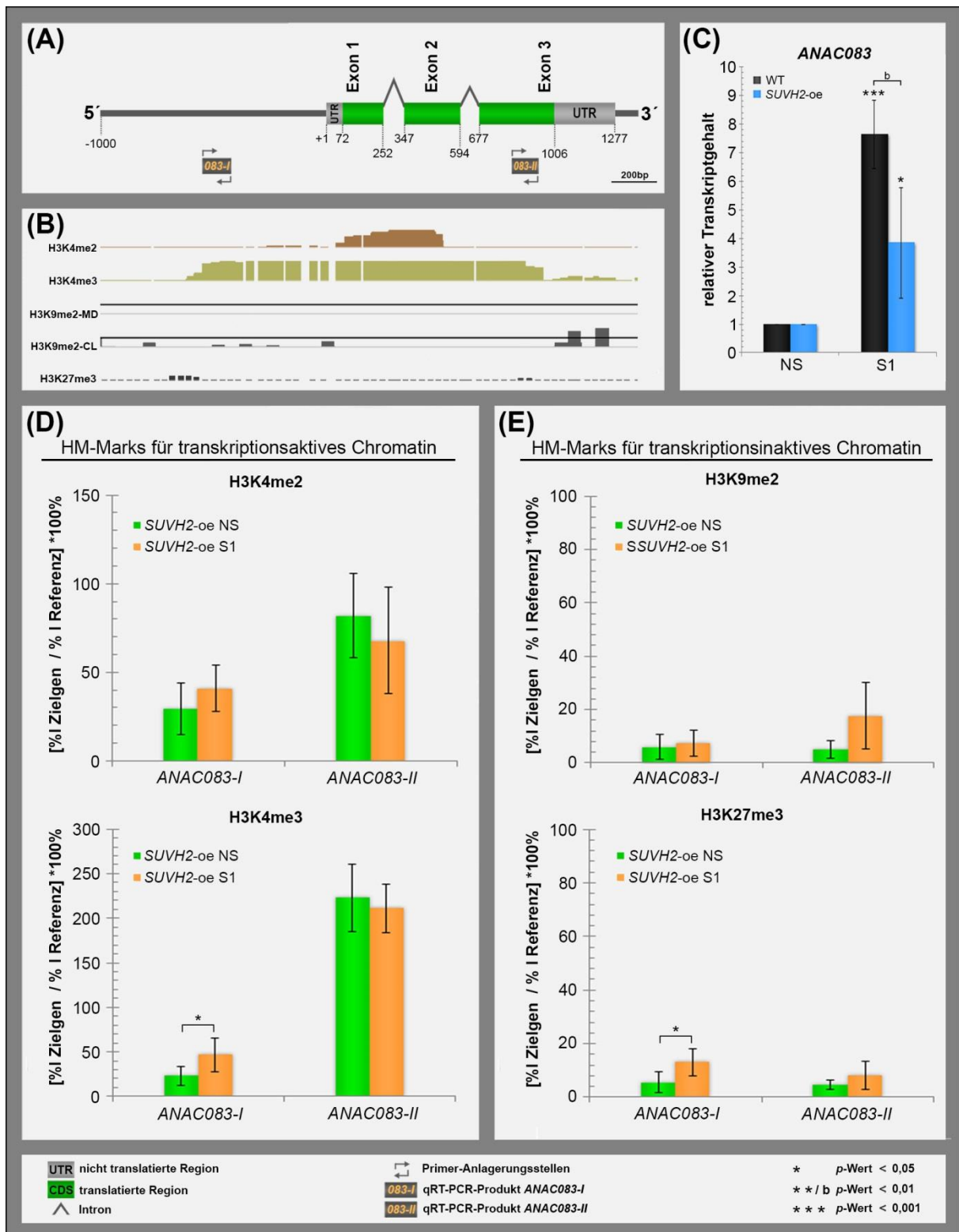


Abbildung III-17: Histonmodifikationsmuster an *ANAC083* in reifem und senescentem Blattmaterial der *SUVH2-oe* Linie. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *ANAC083* (AT5G13180) sowie 1000 bp der DNA-Sequenz *upstream* des TKS. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*ANAC083-I* und *ANAC083-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z-score*) des *USCS Arabidopsis Genome Browser*s zu den korrespondierenden Genbereichen (unter A) für die vier untersuchten Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Muster aus zwei Ansätzen, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren, dargestellt. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinken* und Ultraschall-behandeltem Chromatin (CL). (C) Gezeigt sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *ANAC083* für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und den korrespondierenden Histonmodifikationsmustern für den WT und die *SUVH2-oe*-Linie. Abgebildet sind weiterhin die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien, die unter Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) und gegen die repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *ANAC083*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden.

Jeder Datenpunkt beruht auf vier unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) oder Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** (b) = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

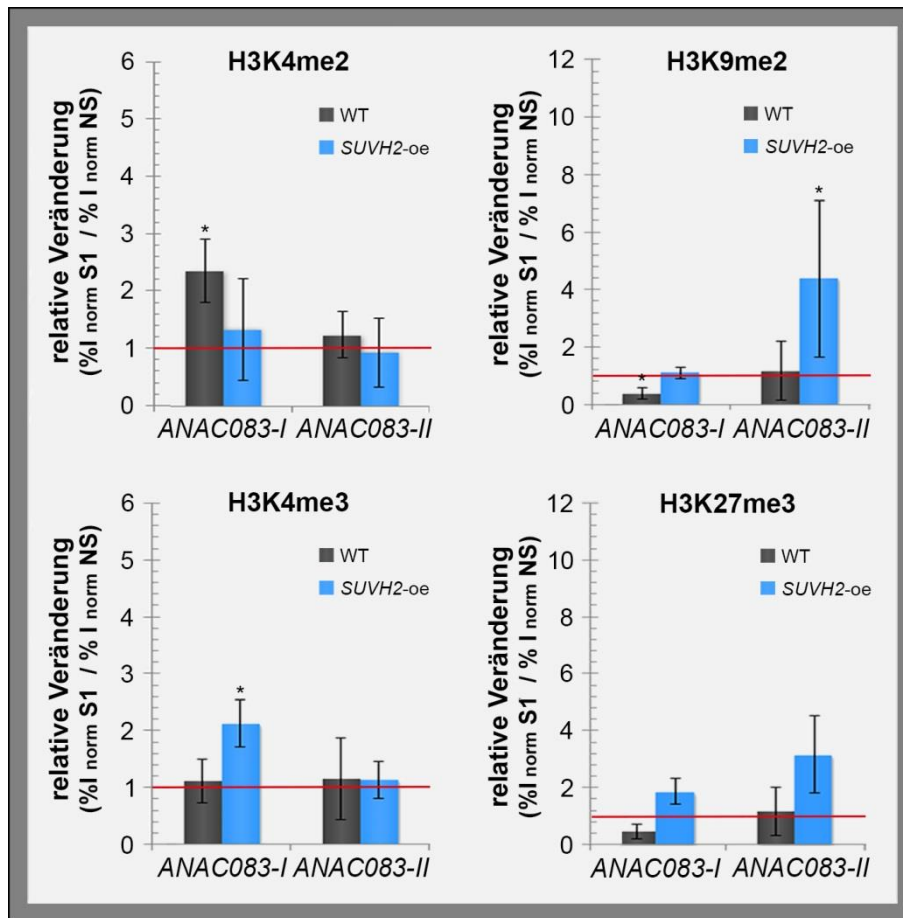


Abbildung III-18: Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an ANAC083 für den WT sowie die SUVH2-oe-Linie während der Seneszenz. Abgebildet sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für das NS- und das S1-Stadium, die unter Verwendung der Antikörper gegen die Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus dem Quotienten der normalisierten %-Inputwerte (%I norm) für das S1-Stadium bezogen auf die des NS-Stadiums. Jeder Datenpunkt beruht auf vier unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Dabei kennzeichnen die dunkelgrauen Balken die Werte für den WT und die blauen Balken entsprechend für die SUVH2-oe-Linie. Die rote Linie markiert jeweils ein Verhältnis des Quotienten von eins, was keine Änderung der Markierung mit entsprechend modifizierten Histonen während der Seneszenz bedeuten würde. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$).

Für die ANAC083-I-Region (Promotor) wurden wie für den WT (s. Kapitel III.3.2.2) relativ geringe Mengen der euchromatischen H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen in reifen Blättern detektiert. Jedoch kommt es nicht wie im WT zu einem Anstieg der H3K4me2-Modifikation. Des Weiteren konnte im Gegensatz zum WT ein leichter Anstieg von H3K4me3 im S1-Stadium detektiert werden. Allerdings ist die detektierte Höhe der %I in der SUVH2-oe-Linie für H3K4me3 im NS-Stadium auch deutlich geringer als im NS-Stadium des WTs (Abb. III-5). Wie für den WT konnten für die SUVH2-oe-Linie deutlich höhere DNA-Mengen für die beiden euchromatischen Modifikationen an der zweiten untersuchten Region des ANAC083-Gens (ANAC083-II) detektiert werden als an ANAC083-I. Zudem kommt es wie im WT auch in der SUVH2-oe-Linie zu keinen Veränderungen zwischen den beiden untersuchten Stadien in diesem Genbereich (Abb. III-18). Für die beiden repressiven Histonmodifikationen (H3K9me2 und H3K27me3) wurde nur eine geringe

Anhäufung an den beiden untersuchten *ANAC083*-Regionen nachgewiesen. Dies war auch für den WT feststellbar (Abb. III-5E). Im Gegensatz zum WT kommt es allerdings an *ANAC083*, insbesondere an der *ANAC083-II*-Region im S1-Stadium, zu einem leichten Anstieg beider repressiver Modifikationen (Abb. III-18).

Demnach führt die Überexpression von SUVH2 nur zu geringen Veränderungen der analysierten Histonmodifikation an den untersuchten *ANAC083*-Genregionen im Vergleich zum WT. So war ein Anstieg repressiver Histonmodifikationen im S1-Stadium feststellbar.

III.4.4.2.1.3 Histonmodifikationsmuster an *WRKY53* in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz.

Die auf das jeweilige Referenzgen normalisierten (s. Appendix A.3 sowie Kapitel V.2.5.13) Daten von sechs biologischen Replikaten der ChIP-Analysen für *WRKY53* in der *SUVH2*-oe-Linie sind in Abbildung III-19D und E zusammengefasst. Abbildung III-20 zeigt die entsprechenden ChIP-Daten als relative Veränderung während der Seneszenz für alle untersuchten Histonmodifizierungen. Dabei sind die relativen Werte, die für die *SUVH2*-oe-Linie erhalten wurden, zur besseren Vergleichbarkeit denen des WT gegenübergestellt. Für beide analysierten *WRKY53*-Regionen wurden im NS-Stadium mit dem WT vergleichbare Mengen (Abb. III-6D) der euchromatischen H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen detektiert (Abb. III-19D). Im S1-Stadium allerdings, bei dem die Induktion der Expression von *WRKY53* in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT reprimiert ist (Abb. III-19C), konnte im Gegensatz zum WT kaum ein Anstieg der aktivierenden H3K4me2 und H3K4me3 Marks detektiert werden (Abb. III-20). Dies ist insbesondere für die H3K4me3-Modifikation auffällig. Gleichzeitig wurde für die beiden repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 wie im WT nur eine sehr geringe Assoziation mit den untersuchten *WRKY53*-Genbereichen im NS-Stadium festgestellt (Abb. III-19E). Es kommt jedoch im S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie im Gegensatz zum WT zu einem deutlichen Anstieg der repressiven Modifikationen an beiden untersuchten *WRKY53*-Genbereichen (Abb. III-19E). So tritt für die *SUVH2*-Überexpressionslinie insbesondere an der *WRKY53-I*-Region eine signifikante Häufung repressiver Histonmodifikationen auf (Abb. III-20).

Zusammenfassend scheint die Überexpression von SUVH2 zu einer Anreicherung repressiver Histonmodifikationen, insbesondere am TLS-nahen Bereich, von *WRKY53* zu führen. Weiterhin ist auffällig, dass die an *WRKY53* im seneszenten Gewebe des WTs beobachtete deutliche Zunahme aktivierender Histonmodifikationen in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen im untersuchten S1-Stadium ausbleibt. Zeitgleich ist in diesen Pflanzen die seneszenzspezifische Induktion der *WRKY53*-Expression deutlich supprimiert.

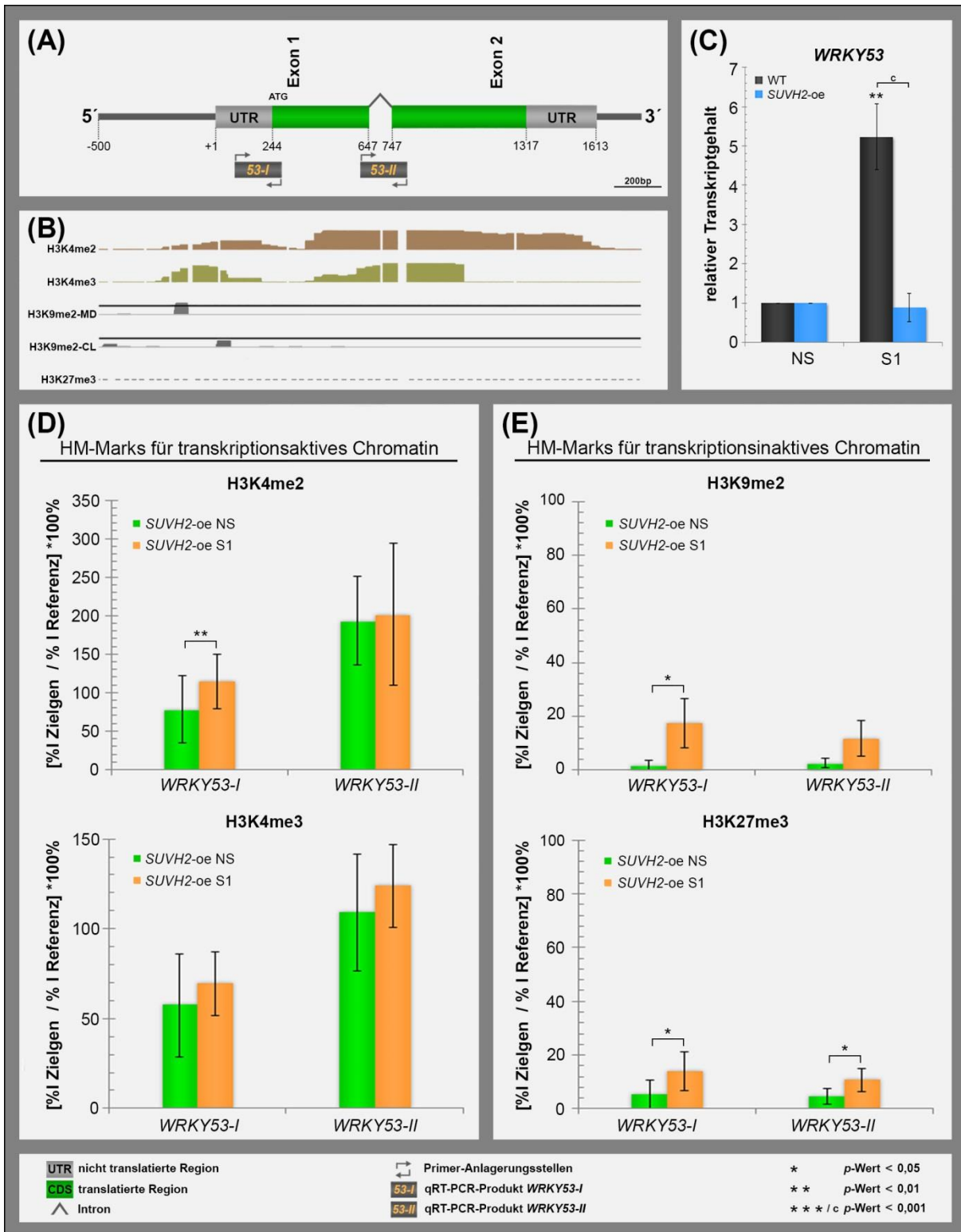


Abbildung III-19: Histonmodifikationsmuster an *WRKY53* in reifem und senescentem Blattmaterial der *SUVH2-oe* Linie. (A) Dargestellt sind die Genstruktur von *WRKY53* (AT4G23810) sowie 500 bp der DNA-Sequenz *upstream* des TKS. Weiterhin ist die Lokalisation der Primer gezeigt, die für die Amplifikation der zwei analysierten Genbereiche (*WRKY53-I* und *WRKY53-II*) in den ChIP-Analysen verwendet wurden. (B) Abgebildet sind die Daten (*z-score*) des *USCS Arabidopsis Genome Browsers* zu den korrespondierenden Genbereichen (unter A) für die vier untersuchten Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me4, H3K9me2 und H3K27me3. Für H3K9me2 sind die ChIP-Muster aus zwei Ansätzen, die auf verschiedenen ChIP-Techniken basieren, dargestellt. Zum einen erfolgte die ChIP an *Micrococcal Nuclease* behandeltem Chromatin (MNase) und zum anderen an durch *Crosslinken* und Ultraschall-behandeltem Chromatin (CL). (C) Gezeigt sind erneut die relativen Transkriptgehalte von *WRKY53* für die beiden in den ChIP-Analysen untersuchten Stadien NS und S1 zur besseren Vergleichbarkeit der Expression und den korrespondierenden Histonmodifikationsmustern für den WT und die *SUVH2-oe*-Linie. Abgebildet sind weiterhin die Ergebnisse der ChIP-Analysen für beide untersuchte Stadien, die unter Verwendung von Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 (D) und gegen die repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 (E) erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus den %-Inputwerten (%I) des Zielgens *WRKY53*, normalisiert auf die %I des jeweiligen Referenzgens, die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die

Standardabweichung). Die Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA erfolgte über qPCR. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; (c) = $p < 0,001$).

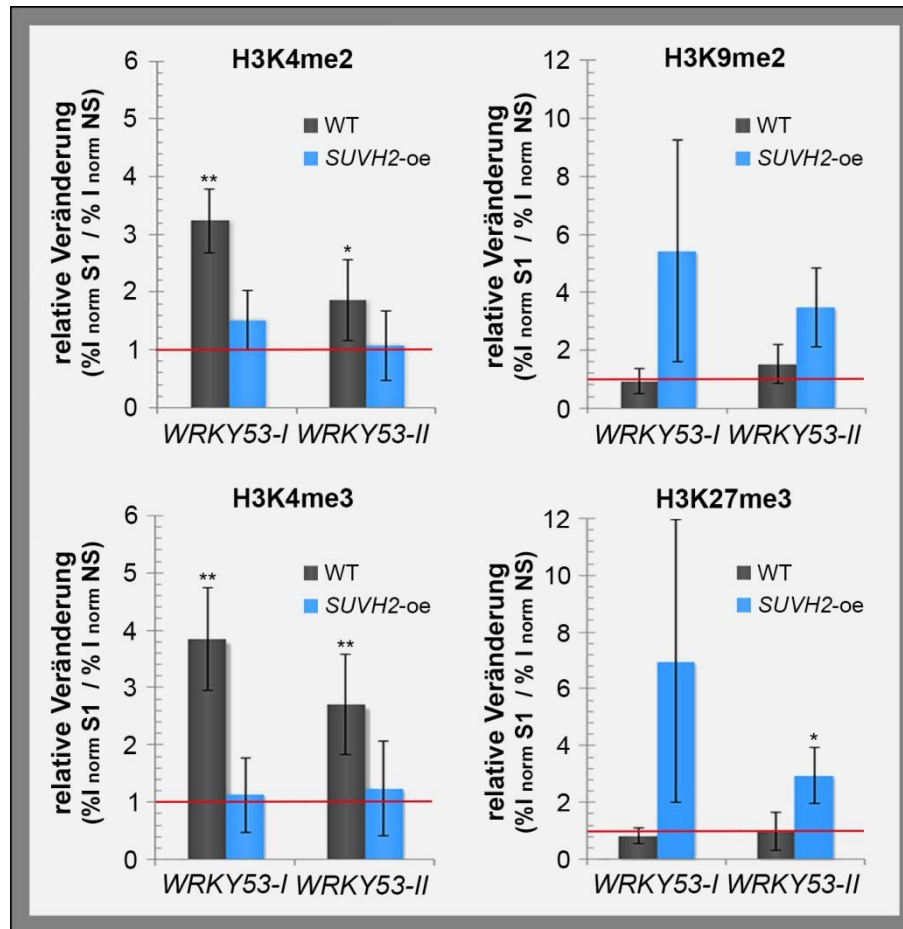


Abbildung III-20: Relative Veränderungen von Histonmodifikationen an WRKY53 für den WT sowie die SUVH2-oe-Linie während der Seneszenz. Abgebildet sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für das NS- und das S1-Stadium, die unter Verwendung der Antikörper gegen die Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus dem Quotienten der normalisierten %-Inputwerte (%I norm) für das S1-Stadium bezogen auf die des NS-Stadiums. Jeder Datenpunkt beruht auf sechs unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Dabei kennzeichnen die dunkelgrauen Balken die Werte für den WT und die blauen Balken entsprechend für die SUVH2-oe-Linie. Die rote Linie markiert jeweils ein Verhältnis des Quotienten von eins, was keine Änderung der Markierung mit entsprechend modifizierten Histonen während der Seneszenz bedeuten würde. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

III.4.4.2.2 DNA-Methylierungsmuster an WRKY53 in WT und SUVH2 überexprimierenden Pflanzen.

Für die zwei am stärksten in ihrem Expressionsverhalten beeinflussten SAGs *SAG12* und *WRKY53* (Abb. III-12) wurde in ChIP-Analysen festgestellt, dass es in der SUVH2-oe-Linie während der Seneszenz u. a. zu einem Anstieg der H3K9me2-Modifikation an den entsprechend assoziiert vorliegenden Histonen kommt (Abb. III-16 und III-20). Für diese Modifikation wurde bereits eine Korrelation mit dem Auftreten von DNA-Methylierung gezeigt (Zhou et al. 2010b; Bernatavichute et al. 2008). Da die DNA-Methylierung in Genbereichen wiederum Änderungen der Genexpression bewirken kann (Zhang et al. 2006) und in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen die seneszenzabhängige Induktion von *WRKY53* fast vollständig unterdrückt ist, erfolgten im Anschluss Untersuchungen des DNA-Methylierungsmusters an *WRKY53*. Dazu wurden mittels Bisulfitsequenzierung drei verschiedene Abschnitte des kodierenden Bereiches des *WRKY53*-Gens,

die schematisch in Abbildung III-21A gezeigt sind, in der *SUVH2*-Überexpressionslinie und dem WT untersucht.

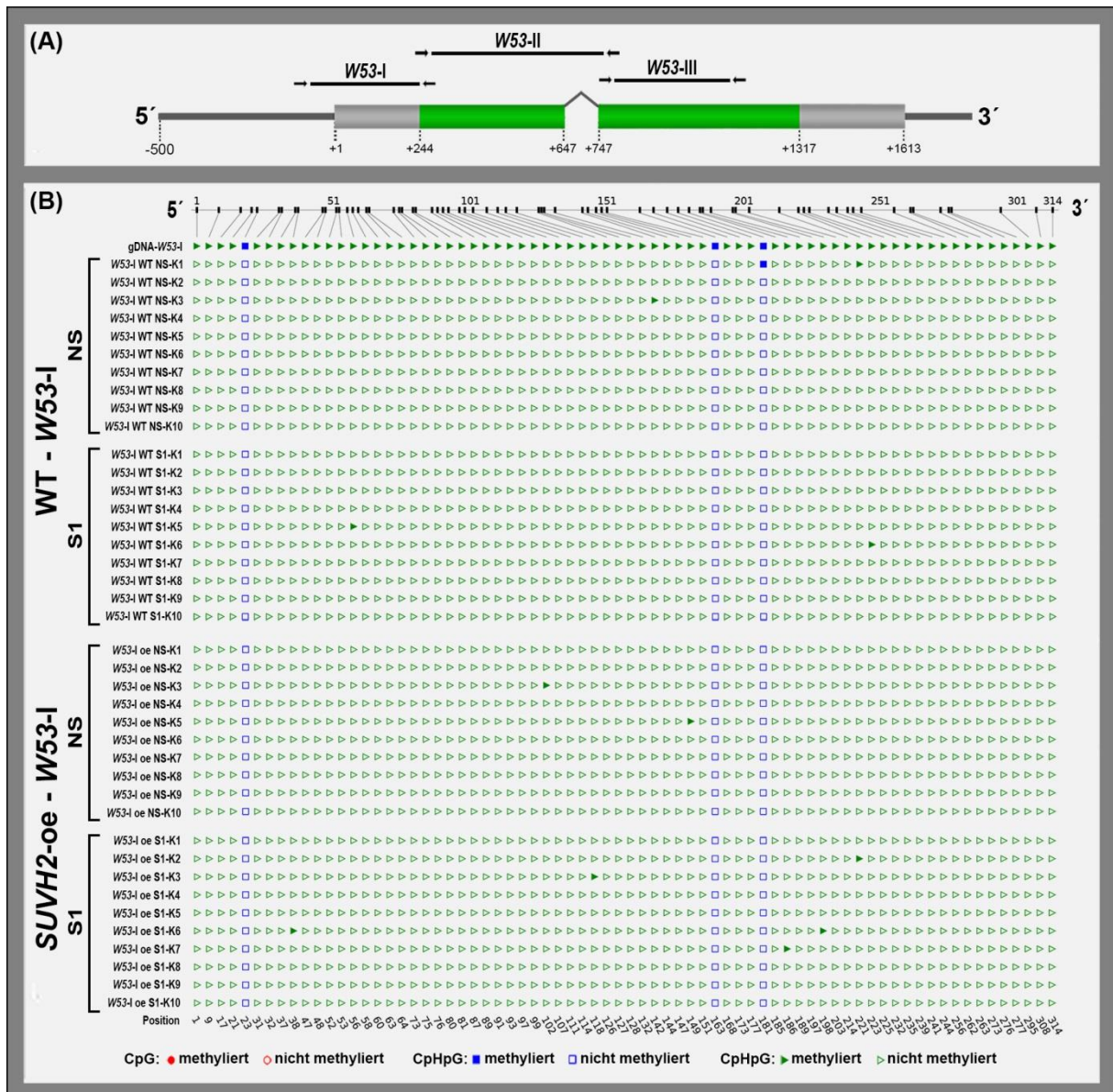


Abbildung III-21: DNA-Methylierungsprofile von *WRKY53-I* im WT und *SUVH2-oe* an reifem und senescentem Blattmaterial. Gezeigt sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für beide untersuchte Stadien (NS und S1) am *WRKY53*-Gen, die mittels Bisulfitssequenzierung erfolgten. (A) Schematische Darstellung des *WRKY53*-Gens sowie der durch schwarze Linien gekennzeichneten DNA-Abschnitte, die über Bisulfitssequenzierung analysiert wurden (W53-I; W53-II; W53-III). Die für die Amplifikation verwendeten Primer sind als schwarze Pfeile abgebildet. (B) Gezeigt sind die durch CyMATE[®] generierten Bilder für das W53-I-Fragment, in denen die ausgefüllten Symbole Cytosinmethylierung und die ungefüllten Symbole nicht methylierte Cytosine kennzeichnen. Dabei ist der Kontext der einzelnen Cytosine unterschieden durch rote Kreise (symmetrische Methylierung im CpG Kontext), blaue Vierecke (symmetrische Methylierung im CpHpG Kontext; H = A, C, T) und grüne Dreiecke (asymmetrische Methylierung im CpHpH Kontext). Auf der linken Seite ist jeweils die Reihenfolge der individuellen Sequenzen der Klone aufgelistet. Es sind beispielhaft jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung von zehn individuellen Klonen (K) für die W53-I-Genregion und jedes Entwicklungsstadium gezeigt.

Zusätzlich erfolgte die Analyse des DNA-Methylierungsmusters von zwei Markergenen. Dabei diente *ELF5A-3* (AT1G69410) als Negativkontrolle, da für dieses Gen in Keimlingen das völlige Fehlen der DNA-Methylierung gezeigt wurde (Zhang et al. 2006). Eine solche Kontrolle dient als Maß für die Konvertierungseffizienz der Bisulfidbehandlung und gibt Aufschluss über die Qualität der Analyse. Als Positivkontrolle wurde ein DNA-Bereich des *MULE*-Retrotransposons (AT2G15810) verwendet. Für dieses *Mutator-like* Element wurde bereits die massive

Methylierung von Cytosinen in Keimlingen gezeigt (Zhang et al. 2006). Die Ergebnisse der Untersuchungen über Bisulfitsequenzierung für diese beiden Markergene sind im Appendix A.6 in Abbildung A-8 und A-9 gezeigt. Die Analysen erfolgten an gDNA, die aus nicht seneszentem (NS-Stadium; basale *WRKY53*-Expression) und seneszentem (S1-Stadium, hoher *WRKY53*-Transkriptgehalt) Blattmaterial (Blatt 5-8) des WT sowie der *SUVH2*-oe-Linie isoliert wurde. Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden wie unter Kapitel V.2.5.14 beschrieben prozessiert und sind jeweils für die drei untersuchten Genbereiche für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie in Abbildung III-21B (*W53*-I-Fragment), III-22 (*W53*-II-Fragment) sowie III-23 (*W53*-III-Fragment) dargestellt. Für den WT konnte für keinen der drei untersuchten DNA-Bereiche des *WRKY53*-Gens die Methylierung von Cytosinen in einem der drei möglichen Kontexte (CpG, CpHpG oder CpHpH, wobei H für jedes Nukleotid mit Ausnahme von Cytosin stehen kann) nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den publizierten Daten von (Zentgraf et al. 2010). Des Weiteren ergab auch die Analyse des DNA-Methylierungsmusters von *WRKY53* in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen keine Veränderungen im Vergleich zum WT.



Abbildung III-22: DNA-Methylierungsprofile von *WRKY53*-II im WT und *SUVH2*-oe an reifem und seneszentem Blattmaterial. Gezeigt sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für beide untersuchten Stadien (NS und S1) am *WRKY53*-II-Fragment (*W53*-II; s. Abb. III-21A), die mittels Bisulfitsequenzierung erfolgten. Dargestellt sind die durch CyMATE[®] generierten Bilder in denen die ausgefüllten Symbole Cytosinmethylierung und die ungefüllten Symbole nicht methylierte Cytosine kennzeichnen. Dabei ist der Kontext der einzelnen Cytosine unterschieden durch rote Kreise (symmetrische Methylierung im CpG Kontext), blaue Vierecke (symmetrische Methylierung im CpHpG Kontext; H = A, C, T) und grüne Dreiecke (asymmetrische Methylierung im CpHpH Kontext). Auf der linken Seite ist jeweils die Reihenfolge der individuellen Sequenzen der Klone (K) aufgelistet. Es sind beispielhaft jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung von zehn individuellen Klonen für die *W53*-II-Genregion und jedes Entwicklungsstadium gezeigt.

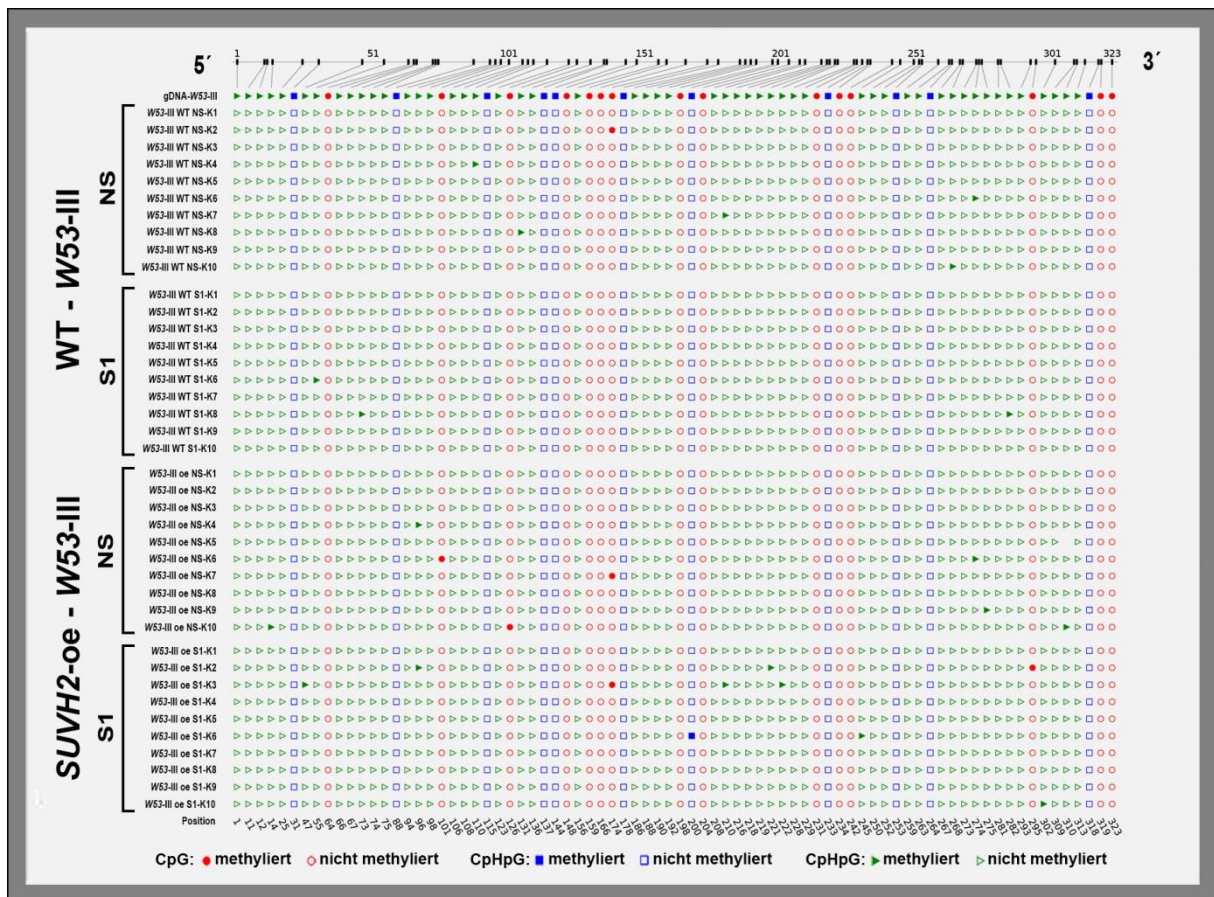


Abbildung III-23: DNA-Methylierungsprofile von *WRKY53-III* im WT und *SUVH2-oe* an reifem und senescentem Blattmaterial. Gezeigt sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für beide untersuchten Stadien (NS und S1) am *WRKY53-III*-Fragment (*W53-III*; s. Abb. III-21A), die mittels Bisulfitssequenzierung erfolgten. Dargestellt sind die durch CyMATE[®] generierten Bilder in denen die ausgefüllten Symbole Cytosinmethylierung und die ungefüllten Symbole nicht methylierte Cytosine kennzeichnen. Dabei ist der Kontext der einzelnen Cytosine unterschieden durch rote Kreise (symmetrische Methylierung im CpG Kontext), blaue Vierecke (symmetrische Methylierung im CpHpG Kontext; H = A, C, T) und grüne Dreiecke (asymmetrische Methylierung im CpHpH Kontext). Auf der linken Seite ist jeweils die Reihenfolge der individuellen Sequenzen der Klone (K) aufgelistet. Es sind beispielhaft jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung von zehn individuellen Klonen für die *W53-III*-Genregion und jedes Entwicklungsstadium gezeigt.

Zusammenfassend scheint die Überexpression von *SUVH2* zum einen sowohl im NS-Stadium als auch im S1-Stadium nicht zu einer Veränderung der DNA-Methylierung an den untersuchten *WRKY53*-Genbereichen zu führen. Zum anderen korreliert die Zunahme der repressiven H3K9me2-Modifikation im S1-Stadium insbesondere an der TLS-nahen Region von *WRKY53* in der *SUVH2-oe*-Linie nicht mit einer Veränderung der DNA-Methylierung in diesen Bereichen.

III.5 Identifizierung neuer regulatorischer Komponenten der Blattseneszenz als mögliche Ziele von Chromatinveränderungen während der Seneszenz.

Die vorangegangenen Arbeiten zeigten deutliche Veränderungen des Expressionsverhaltens eines Sets von SAG-Markergenen in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen (s. Kapitel III.4.3.1). Für drei dieser SAGs konnte zudem nachgewiesen werden, dass seneszenzabhängig lokale Veränderungen des assoziierten Histonmodifikationsmusters im WT auftreten (s. Kapitel III.3.2) und dass teilweise Änderungen dieses Musters in der *SUVH2*-Überexpressionslinie auftreten (s. Kapitel III.4.4.2.1). Zum Zeitpunkt der Arbeiten war bekannt, dass weit über 100 Gene, die für TFs kodieren, eine

gesteigerte Expression während der Seneszenz aufweisen (Guo et al. 2004; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Balazadeh et al. 2008). Solche Gene stellen ebenfalls potentielle Ziele für die Regulation durch lokale Chromatinveränderungen während der Seneszenz dar. Daher erfolgten innerhalb dieser Arbeit umfassende vergleichende Expressionsanalysen von SAGs, die für regulatorische Faktoren kodieren zwischen WT- und *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen. Dabei sollte die *SUVH2*-oe-Linie als eine Art Werkzeug dienen, seneszenzassoziierte regulatorische Faktoren zu identifizieren, die eine deutliche Veränderung ihres Expressionsverhaltens während der Seneszenz im Vergleich zum WT aufweisen. Für die Analysen wurde eine weiter entwickelte Version der *Expressionsprofiling*-Plattform verwendet, die durch Czechowski et al. (2004) entwickelt wurde. Diese Methode erlaubt die vergleichende Expressionsanalyse mittels qRT-PCR von etwa 1800 Genen, die für regulatorischen Faktoren kodieren und damit die Mehrheit der TFs in Arabidopsis abdecken.

III.5.1 *Expressionsprofiling* von Transkriptionsregulatoren in WT- und *SUVH2*-Überexpressionspflanzen während der Seneszenz.

Die vergleichenden Expressionsanalysen erfolgten an RNA-Material, das aus reifem (NS-Stadium) und seneszentem (S1-Stadium) Blattmaterial des WTs sowie der *SUVH2*-oe-Linie extrahiert wurde. Dabei wurden jeweils drei biologische Replikate durchgeführt (s. Kapitel V.2.5.7.3 sowie Ay et al. 2014b). Die resultierenden Genexpressionsdaten wurden basierend auf der vergleichenden CT-Methode (Balazadeh et al. 2008) bearbeitet. Allerdings erfolgte die Normalisierung der erhaltenen CT-Werte nicht wie bei Balazadeh et al. (2008) beschrieben auf die Expressionsdaten von *UBQ10* (AT4G05320), sondern auf die CT-Werte des Referenzgens *ACTIN2* (AT3G18780). Dabei wurden in Vorversuchen insgesamt drei bekannte Referenzgene (*ACTIN2*, *GAPDH* und *UBQ10*) hinsichtlich ihrer Expression in allen Stadien und Linien untersucht, wobei *ACTIN2* die stabilste Expression in allen Proben aufwies (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsdaten der insgesamt 1870 Gene sind aus Platzgründen nicht in dieser Arbeit aufgeführt. Allerdings sind sie verfügbar im *Supplementary Dataset DS 1a* in einer der Publikationen zu dieser Arbeit (Ay et al. 2014b). 627 Gene konnten innerhalb der qRT-PCR-Analysen in mindestens einem Replikat und/oder in mindestens einer Probe nicht detektiert werden (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 1b*). Von diesen Genen wiesen 440 keine oder nur eine sehr geringe Expression (CT-Werte ≥ 30) in allen drei Replikaten und in beiden untersuchten Entwicklungsstadien des WTs sowie der *SUVH2*-oe-Linie auf. Demnach handelt es sich hier um Gene, die nicht in Rosettenblättern von Arabidopsis zu den untersuchten Entwicklungsstadien exprimiert werden. Für 30 der restlichen 187 Gene dieser Gruppe (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 1c*) konnte eine sehr geringe (CT-Werte ≥ 30) oder nicht nachweisbare Expression in reifen Blättern (NS-Stadium) des WTs, jedoch eine gesteigerte Expression im S1-Stadium (CT-Werte < 30) detektiert werden. Einige dieser Gene kodieren für bekannte seneszenzassoziierte TFs wie MYB90

[AT1G66390] und WRKY75 [AT5G13080] (Pourtau et al. 2006; Li et al. 2012). 1243 der insgesamt 1870 analysierten Gene konnten in allen drei biologischen Replikaten und in allen untersuchten Stadien und Linien detektiert werden. Für die Expressionsdaten dieser Gene erfolgte eine unter Kapitel V.2.5.7.3 sowie V.2.6.3.2 beschriebene Datenprozessierung sowie eine erste statistische Analyse. 87 Gene wurden innerhalb dieser Qualitätskontrolle von den weiteren Analysen ausgeschlossen (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS1b,e*). Die Expressionsprofile der 1156 verbliebenen Gene wurden im Anschluss hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den normalisierten CT-Werten (Δ CT-Werte) der beiden zu vergleichenden Entwicklungsstadien (NS und S1) unter Verwendung eines *t*-Tests des *MultiExperiment Software tools* (MeV 4.8.1, Saeed et al. 2006; Saeed et al. 2003) für den WT sowie die *SUVH2*-oe-Linie getrennt analysiert. Diejenigen Gene, für deren Expression zwischen den zwei verglichenen Proben ein Unterschied mit einem Signifikanzwert (*p*-Wert) $< 0,05$ gezeigt werden konnte, wurden als signifikant unterschiedlich zueinander exprimiert gekennzeichnet (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 1f*). Des Weiteren wurden Gene als differentiell reguliert definiert, sobald die signifikante Veränderung \geq vier war [*Fold Change* = X-fache Änderung = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \geq$ vierfach ($\log_2 \geq 2$) oder $\leq 0,25$ fach ($\log_2 \leq -2$)].

III.5.2 Identifizierung von seneszenzabhängig exprimierten regulatorischen Faktoren im WT.

Unter Verwendung der im vorigen Kapitel genannten Parameter wurden im Rahmen des *Expressionsprofilings* für den WT 383 Gene, also 20% der gesamten TF-Plattform, als differentiell exprimiert im S1-Stadium im Vergleich zum NS-Stadium für den WT identifiziert (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 2a,b*). Von diesen 383 als seneszenzassoziierte regulatorische Faktoren (SARFs) bezeichneten Genen wiesen 314 eine signifikante Steigerung (im weiteren bezeichnet als *senescence upregulated regulatory factors* [SURFs]) sowie 69 eine signifikante Verringerung (im weiteren bezeichnet als *senescence downregulated regulatory factors* [SDRFs]) auf. Im Vergleich zu anderen multiparallelen Expressionsanalysen durch Microarrays (Buchanan-Wollaston et al. 2005; Schmid et al. 2005; van der Graaff, Eric et al. 2006; Breeze et al. 2011) oder *Expressionsprofiling*-qRT-PCR-Analysen (Balazadeh et al. 2008) wurde die größte Überlappung der identifizierten SURFs mit den Daten, die durch Breeze et al. (2011) publiziert wurden, gefunden. Insgesamt 150 der Gene konnten in beiden Experimenten als induziert während der Seneszenz identifiziert werden. Bei etwa 60 der in dieser Arbeit identifizierten SURFs handelt es sich um putative neue SAGs, da sie bislang in keinem der publizierten SAG-Expressionsdatensätzen als solche identifiziert wurden. Die größte Überlappung der als SDRFs identifizierten Gene wurde mit den qRT-PCR-Plattformdaten von Balazadeh et al. (2008) festgestellt. 37 der 69 SDRFs weisen dabei ein ähnliches Expressionsverhalten während der Seneszenz in beiden Datensätzen auf.

III.5.3 Vergleich der Expressionsmuster regulatorischer Faktoren zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie.

Um nach Unterschieden im Expressionsverhalten von differentiell regulierten Genen zu suchen, erfolgte ein Vergleich der Expressionsdaten der *SUVH2*-oe-Linie mit denen des WT. Die Gegenüberstellung der 383 differentiell im WT regulierten Gene mit den Expressionsdaten der *SUVH2*-Überexpressionslinie ist in Abbildung III-24 grafisch dargestellt und ergab, dass 188 dieser 383 Gene ebenfalls in der *SUVH2*-oe-Linie differentiell reguliert sind. So sind im S1-Stadium im Vergleich zum NS-Stadium sowohl in der *SUVH2*-oe-Linie als auch im WT 176 Gene signifikant induziert sowie zwölf Gene signifikant vermindert exprimiert. Demnach weisen etwa 50% der im WT identifizierten SARFs ein ähnliches Genexpressionsverhalten zum untersuchten S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie auf (aufgelistet Appendix A.7; Tab. A.2 sowie in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 3a,b*).

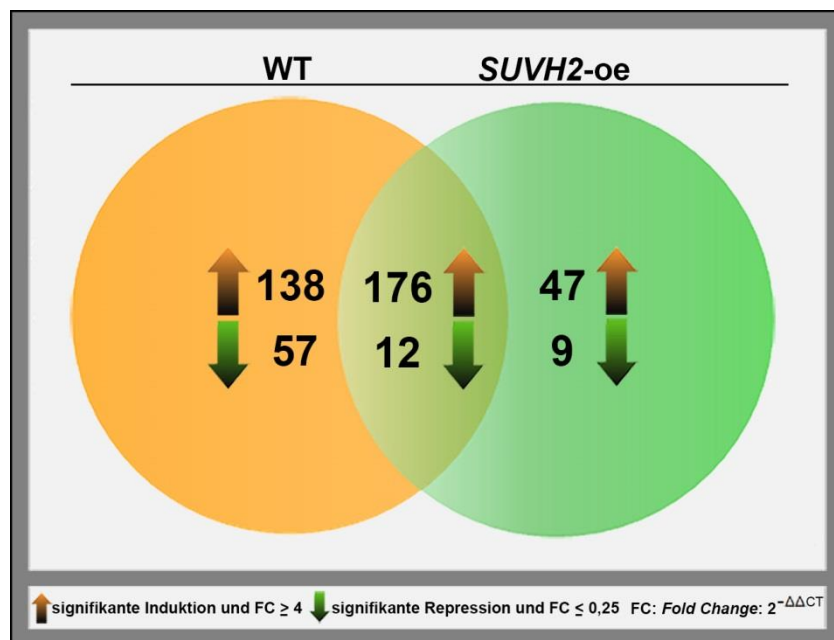


Abbildung III-24: Venn-Diagramm der seneszenzabhängig im WT und der *SUVH2*-oe-Linie differentiell regulierten Gene. Gezeigt ist ein Venn-Diagramm, das die Überlappung aller Gene anzeigt, die während der Seneszenz in Arabidopsisblättern (Blatt 5-8) des WT und der *SUVH2*-oe-Linie signifikant reguliert sind. Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn eine signifikante (p_c -Wert < 0,05) Veränderung ≥ 4 auftrat [$Fold\ Change = X$ -fache Änderung; $2^{-\Delta\Delta CT} \geq$ vierfach ($\log_2 \geq 2$) oder $2^{-\Delta\Delta CT} \leq 0,25$ ($\log_2 \leq -2$)]. p_c - korrigierter p -Wert [FDR-Ansatz von Benjamini und Hochberg (1995)]; FDR = False Discovery Rate

Im Unterschied dazu sind 195 von den 383 im WT differentiell regulierten Gene deutlich verändert in der *SUVH2*-oe-Linie exprimiert. So wurde für 138 der 314 SURFs sowie für 57 der 69 SDRFs ausschließlich im WT eine seneszenzabhängige Änderung der Expression detektiert. Des Weiteren sind 47 Gene ausschließlich in der *SUVH2*-oe-Linie in ihrer Expression induziert bzw. neun Gene reprimiert. Zusätzlich zu dem Vergleich der Expressionsmuster der 383 differentiell regulierten Gene im WT, wurde auch das Expressionsverhalten der Gene in den einzelnen Entwicklungsstadien genauer betrachtet. Bei dem Vergleich der einzelnen Stadien zwischen den beiden Linien galten die Gene als differentiell reguliert, wenn eine signifikante Veränderung (p_c -Wert < 0,05) ≥ 2 auftrat ($Fold\ Change = X$ -fache Änderung = $2^{-\Delta\Delta CT} \geq$ doppelt ($\log_2 \geq 1$) oder $\leq 0,5$ ($\log_2 \leq -1$)). Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind in Tortendiagrammen in Abbildung III-25 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass im Kontrollstadium NS von den 1156 detektierten Genen 1067 (~92,3%) eine vergleichbare Expression im WT und der *SUVH2*-oe-Linie aufwiesen. 89

Gene (~7,7%) zeigten eine differentielle Regulation, wobei 71 Gene signifikant höher sowie 18 Gene signifikant schwächer in der *SUVH2*-oe-Linie exprimiert wurden als im WT. Im Gegensatz dazu wurden im Vergleich des S1-Stadiums 202 der 1156 detektierten Gene (~17,5 %) als differentiell reguliert klassifiziert. Von diesen zeigten 125 Gene eine signifikant höhere sowie 77 Gene eine signifikant schwächere Expression in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT.

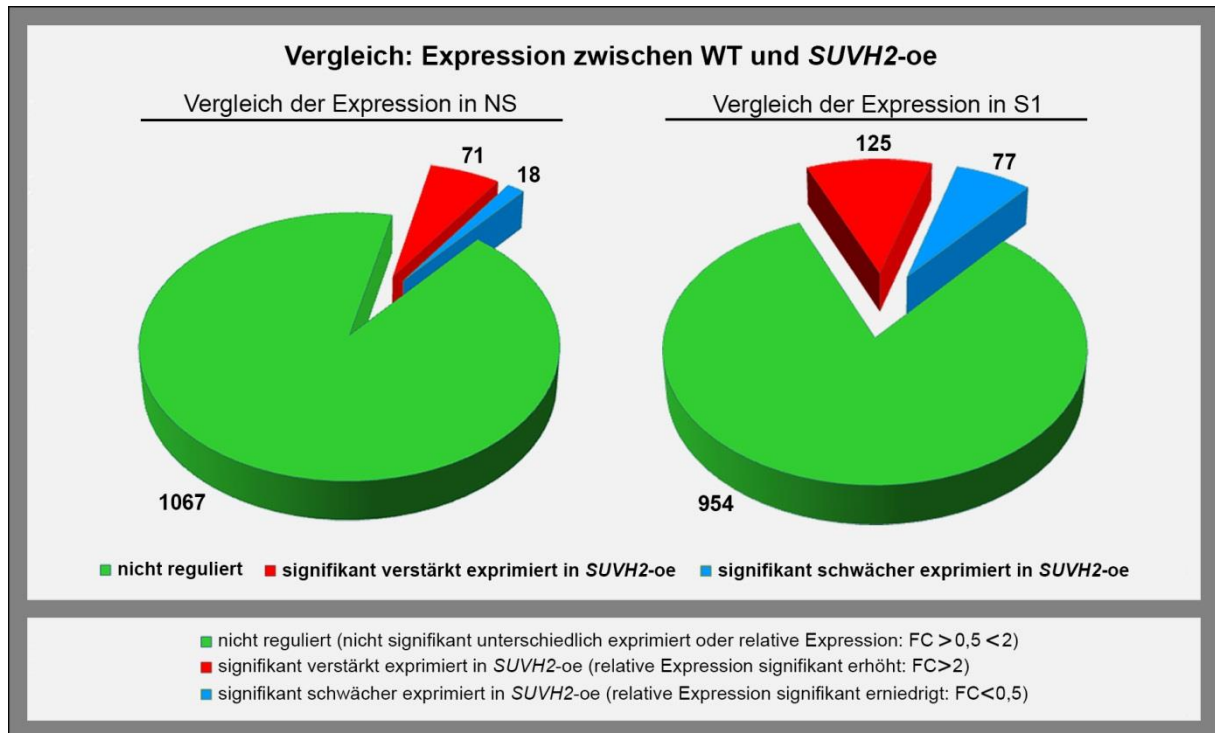


Abbildung III-25: Verhältnisse von differentiell regulierten Genen in den untersuchten Entwicklungsstadien NS und S1 zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie. Die Tortendiagramme zeigen den Anteil von differentiell und nicht regulierten Genen im Verhältnis zu der Gesamtzahl aller detektierten Gene für den entsprechenden Vergleich der Entwicklungsstadien NS bzw. S1 zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie. Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn eine signifikante Veränderung (p_c -Wert $< 0,05$) von ≥ 2 auftrat ($Fold\ Change = X$ -fache Änderung; $2^{-\Delta\Delta CT} \geq$ zweifach ($\log_2 \geq 1$) oder $2^{-\Delta\Delta CT} \leq 0,5$ ($\log_2 \leq -1$)). p_c - korrigierter p -Wert [FDR-Ansatz von Benjamini und Hochberg (1995)]; FDR = *False Discovery Rate*

Zusammenfassend führt die Überexpression von SUVH2 in reifen, nicht seneszenten Blättern kaum zu Veränderungen der Genexpression im Vergleich zum WT. Im Gegensatz dazu ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen dem WT und *SUVH2*-oe-Linie bei dem Vergleich des S1-Stadiums sowie insbesondere bei der Regulation der 383 im WT als differentiell reguliert definierten SARFs. Dabei kommt es zum einen zur Suppression der seneszenzspezifischen Induktion von über 40% der im WT identifizierten 314 SURFs. Zum anderen ist die Expression der Mehrheit (~83%) der 69 SDRFs ausschließlich im WT, nicht aber der *SUVH2*-oe-Linie, reprimiert.

III.5.4 Untersuchungen zum Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Regulation von Genfamilien.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von SUVH2 Auswirkungen auf spezielle Genfamilien der im WT differentiell regulierten Gene hat, erfolgte eine sog. Überrepräsentationsanalyse (s. Kapitel V.2.6.3.3). Diese Untersuchung wurde unter Verwendung des *Fisher Exact Tests* in 2x2

Kontingenztafeln durchgeführt. Die Ergebnisse der Überrepräsentationsanalyse sind in Tabelle III.2 zusammengefasst. Dabei konnte für den WT festgestellt werden, dass die CCAAT-HAP2-, NAC- und WRKY-TF-Familien überrepräsentiert in der Gruppe der induzierten Gene sind. So sind im WT die relativen Transkriptgehalte aller acht Mitglieder der CCAAT-HAP2-Familie, 39 der 59 NAC-TF sowie 27 der 46 WRKY-TF signifikant während der Seneszenz erhöht. Weiterhin ist auffällig, dass viele Gene, die Mitglieder der großen TF-Familien C2H2 (19 der 86 Gene), HB (12 der 64 Gene) und MYB (27 der 98 Gene) kodieren, im S1-Stadium des WTs induziert werden. Somit ist auch für diese TF-Familien eine Bedeutung für den Seneszenzprozess indiziert.

Tabelle III.2. Überrepräsentationsanalyse der Transkriptionsfaktorfamilien in WT- und *SUVH2*-oe Pflanzen.

FAMILIE	WT induziert				WT reprimiert				<i>SUVH2</i> -oe induziert				<i>SUVH2</i> -oe reprimiert				
	N	n	OR	P	Pc	n	OR	P	Pc	n	OR	P	Pc	n	OR	P	Pc
ABI3VP1	23	7	1.2	0.45	1.00	4	3.4	0.04	0.51	4	0.9	0.69	1.00	0	0.0	1.00	1.00
AP2-EREBP	84	29	1.4	0.08	0.67	9	2.0	0.06	0.51	15	0.9	0.70	1.00	3	2.2	0.18	1.00
ARF	15	2	0.4	0.95	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
ARR-B / GARP-ARR-B	6	2	1.3	0.52	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
AS2 (LOB) 1	15	4	0.0	0.62	1.00	0	0.0	1.00	1.00	5	2.1	0.15	1.00	1	4.1	0.24	1.00
AUX/IAA	22	1	0.1	1.00	1.00	3	2.5	0.14	1.00	1	0.2	0.99	1.00	0	0.0	1.00	1.00
BBR/BPC	7	1	0.4	0.89	1.00	0	0.0	1.00	1.00	1	0.7	0.78	1.00	0	0.0	1.00	1.00
bHLH	101	15	0.4	1.00	1.00	12	2.3	0.01	0.34	12	0.5	0.99	1.00	2	1.1	0.55	1.00
bZIP	55	20	1.5	0.09	0.67	2	0.6	0.86	1.00	12	1.2	0.39	1.00	2	2.2	0.25	1.00
C2C2(Zn) CO-like	22	3	0.4	0.96	1.00	0	0.0	1.00	1.00	6	1.6	0.25	1.00	0	0.0	1.00	1.00
C2C2(Zn) DOF	26	5	0.6	0.88	1.00	3	2.1	0.20	1.00	4	0.7	0.78	1.00	0	0.0	1.00	1.00
C2C2(Zn) GATA	24	4	0.5	0.93	1.00	5	4.4	0.01	0.34	1	0.2	0.99	1.00	0	0.0	1.00	1.00
C2H2	86	19	0.7	0.90	1.00	4	0.7	0.78	1.00	11	0.6	0.97	1.00	1	0.6	0.80	1.00
C3H	25	7	1.0	0.55	1.00	0	0.0	1.00	1.00	5	1.0	0.56	1.00	0	0.0	1.00	1.00
CAMTA	7	4	3.6	0.09	0.67	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
CCAAT-DR1	2	2	13.0	0.08	0.67	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
CCAAT-HAP2	8	8	46.1	2.98E-05	4.97E-04*	0	0.0	1.00	1.00	6	12.7	1.03E-03	0.02*	0	0.0	1.00	1.00
CCAAT-HAP3	7	0	0.0	1.00	1.00	1	2.6	0.35	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
CCAAT-HAP5	10	2	0.7	0.81	1.00	0	0.0	1.00	1.00	2	1.0	0.61	1.00	0	0.0	1.00	1.00
CPP(Zn)	8	2	0.9	0.69	1.00	1	2.3	0.39	1.00	1	0.6	0.83	1.00	2	20.5	7.81E-03	0.29
E2F-DP	7	1	0.4	0.89	1.00	2	6.4	0.06	0.51	1	0.7	0.78	1.00	0	0.0	1.00	1.00
EIL	3	1	1.3	0.62	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
FHA	4	1	0.9	0.72	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
G2-like / GARP-G2-like	32	5	0.5	0.96	1.00	0	0.0	1.00	1.00	6	0.9	0.62	1.00	0	0.0	1.00	1.00
GeBP	11	4	1.5	0.35	1.00	1	1.6	0.50	1.00	2	0.9	0.67	1.00	0	0.0	1.00	1.00
GIF	3	2	5.3	0.18	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
GRAS	28	8	1.1	0.52	1.00	0	0.0	1.00	1.00	3	0.5	0.93	1.00	0	0.0	1.00	1.00
HB	64	12	0.6	0.96	1.00	3	0.8	0.76	1.00	14	1.2	0.36	1.00	1	0.9	0.69	1.00
HMG	10	3	1.1	0.55	1.00	1	1.7	0.46	1.00	2	1.0	0.61	1.00	0	0.0	1.00	1.00
HSF	17	6	1.5	0.31	1.00	0	0.0	1.00	1.00	5	1.7	0.23	1.00	0	0.0	1.00	1.00
LIM	5	0	0.0	1.00	1.00	1	4.0	0.27	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
MADS	43	9	0.7	0.88	1.00	4	1.6	0.26	1.00	8	0.9	0.63	1.00	0	0.0	1.00	1.00
MBF1	3	1	1.3	0.62	1.00	0	0.0	1.00	1.00	1	2.1	0.48	1.00	0	0.0	1.00	1.00
MYB	98	27	1.0	0.53	1.00	6	1.0	0.55	1.00	21	1.1	0.35	1.00	3	1.9	0.25	1.00
MYB-related	32	6	0.6	0.91	1.00	1	0.5	0.87	1.00	3	0.4	0.97	1.00	1	1.8	0.44	1.00
NAC	59	39	5.8	2.02E-10	1.01E-08*	1	0.3	0.98	1.00	31	5.1	5.42E-09	2.71E-07*	1	0.0	0.66	1.00
Orphans	1	1	8.0	0.27	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
PHD	8	2	0.9	0.69	1.00	0	2.3	0.39	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
PLATZ	7	3	2.0	0.29	1.00	1	0.0	1.00	1.00	3	3.1	0.14	1.00	0	0.0	1.00	1.00
RWP-RK (NIN-like)	8	2	0.9	0.69	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00	0	0.0	1.00	1.00
SBP	14	0	0.0	1.00	1.00	1	1.2	0.58	1.00	1	0.3	0.95	1.00	0	0.0	1.00	1.00
SET	8	0	0.0	1.00	1.00	1	2.3	0.39	1.00	0	0.0	1.00	1.00	2	20.5	7.81E-03	0.29
SRS	6	1	0.5	0.85	1.00	0	0.0	1.00	1.00	1	0.8	0.73	1.00	0	0.0	1.00	1.00
TCP	21	3	0.4	0.95	1.00	0	0.0	1.00	1.00	3	0.7	0.81	1.00	0	0.0	1.00	1.00
Tify	10	4	1.8	0.28	1.00	0	0.0	1.00	1.00	4	2.8	0.11	1.00	0	0.0	1.00	1.00
TRAF	2	1	2.7	0.47	1.00	0	0.0	1.00	1.00	1	4.1	0.35	1.00	0	0.0	1.00	1.00
Tribelix	15	3	0.7	0.82	1.00	0	0.0	1.00	1.00	4	1.5	0.33	1.00	0	0.0	1.00	1.00
ULT	1	0	0.0	1.00	1.00	1	47.2	0.06	0.51	0	0.0	1.00	1.00	1	171.0	0.02	0.29
WRKY	46	27	4.0	5.24E-06	1.31E-04*	0	0.0	1.00	1.00	20	3.4	1.29E-04	3.24E-03*	0	0.0	1.00	1.00
ZF-HD	12	1	0.2	0.98	1.00	0	0.0	1.00	1.00	1	0.4	0.93	1.00	0	0.0	1.00	1.00

Die Überrepräsentationsanalyse wurde unter Verwendung des *Fisher Exact Tests* in 2x2 Kontingenztafeln durchgeführt. Dabei wurde der *p-Wert* (P) erhalten. *Pc* stellt den FDR (*False Discovery Rate*) korrigierten *p-Wert* dar. (*) Sternchen markieren *Pc*-Werte < 0,05. Die *Odds ratio* (OR) ist ein Maß für das Verhältnis zweier Ereignisse (reguliert / nicht reguliert). Die Gesamtanzahl einer jeden Genfamilie (N) sowie die Anzahl der regulierten Gene einer jeden Familie (n) sind gegeben. Insgesamt wurden 1131 Gene in den Analysen betrachtet. Rot hervorgehoben sind Familien für die eine Überrepräsentation gezeigt werden konnte.

Die für den WT als überrepräsentiert in der Gruppe der induzierten Gene gezeigten Familien (CCAAT-HAP2, NAC und WRKY) wurden ebenfalls als überrepräsentiert in der Gruppe der induzierten Gene für die *SUVH2*-oe-Linie identifiziert (Tab. III.2). Allerdings sind in Abhängigkeit von der TF-Familie weniger Vertreter, der im WT verstärkt exprimierten Gene, ebenfalls in

SUVH2 überexprimierenden Pflanzen induziert. Dabei sind sechs der acht im WT induzierten Gene, die für CCAAT-HAP2-TF kodieren, auch in der *SUVH2*-oe-Linie signifikant induziert. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede der Expression der Gene, die für die TFs der NAC- und WRKY-Familie kodieren, in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT größer. Während im WT 39 der 60 detektierten NAC-kodierenden Gene verstärkt exprimiert werden, konnte in der *SUVH2*-oe-Linie nur eine erhöhte Transkriptmenge für 31 Mitglieder festgestellt werden. Weiterhin zeigten nur 20 der für WRKY-TF-kodierenden Gene eine erhöhte Expression in der *SUVH2*-oe-Linie, während dies für 27 Vertreter dieser Familie im WT detektiert wurde. Ein noch deutlicherer Effekt der SUVH2-Überexpression zeigte sich jedoch für die AP2-EREBP-, bZIP- und die C2H2-Familie. Etwa 50% der im WT seneszenzabhängig induzierten Gene dieser Familien sind nicht oder stark vermindert in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz induziert. Im Gegensatz dazu zeigten andere Familien wie die bHLH-, C3H-, G2-like- und die HB-TFs kaum einen Effekt auf die seneszenzabhängige Induktion der Expression ihrer Familienmitglieder durch die Überexpression von SUVH2. Für die Gruppe der seneszenzabhängig herunterregulierten Gene konnte sowohl im WT als auch in der *SUVH2*-oe-Linie für keine der untersuchten TF-Familien eine Überrepräsentation festgestellt werden (Tab. III.2). Dennoch sind im WT zwischen 10% und 20% der detektierten Mitglieder der AP2-EREBP- und bHLH-Familien im WT herunterreguliert und stellen damit die am stärksten im Seneszenzprozess betroffenen Genfamilien dar. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Mehrheit der im WT reprimierten Gene nicht in der *SUVH2*-oe-Linie herunterreguliert werden. Dabei sind die meisten Genfamilien, von denen Vertreter im WT während der Seneszenz vermindert exprimiert werden, in der *SUVH2*-oe-Linie betroffen. Die stärksten Effekte waren für die bHLH-, AB2-EREBP- und C2H2-TF-Familien feststellbar. So sind z.B. nur zwei der 15 im WT herunterregulierten Gene die für bHLH-TFs kodieren ebenfalls in der *SUVH2*-Überexpressionslinie reprimiert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Überexpression von SUVH2 bevorzugt die Expression bestimmter seneszenzassoziierter TF-Familien beeinflusst, wohingegen andere keine oder nur geringe Veränderungen in ihrem Expressionsverhalten aufweisen.

III.5.5 Clusteranalysen der seneszenzassozierten regulatorischen Faktoren im WT und in der *SUVH2*-oe-Linie.

Nachfolgend wurden über Clusteranalysen Gruppen von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen unter den 383 differentiell regulierten Genen des WTs und den korrespondierenden Daten der *SUVH2*-oe-Linie identifiziert (s. Kapitel V.2.6.2). Dabei sollten genauere Aussagen über den Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Expressionsmuster dieser Gene erlangt werden. Die Clusteranalysen erfolgten an den normalisierten CT-Werten (Δ CT) für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie für die zwei Stadien NS und S1 unter Verwendung des sog. *k-Means / k-Medians* Clustering (KMC)-Programms (mit Pearson Korrelation; s. Kapitel V.2.6.2) des *MultiExperiment Viewer tools*

(MeV 4.8.1) der TIGR TM4 Software (Saeed et al. 2006; Saeed et al. 2003). Nach der Bestimmung der optimalen Clusteranzahl durch den *figure of merit*-Algorithmus (FOM) wurden fünf in Abbildung III-26 gezeigte distinkte Cluster erhalten, die Gruppen von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen inkludieren (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4a-f). Alle 69 im WT reprimierten Gene (SDRFs) wurden der Gruppe des Cluster 1 zugeordnet (Abb. III-26; aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4b). Wie durch den Mittelwert des Clusters gezeigt (Abb. III-26; grüne dicke Linie), sind diese Gene im S1-Stadium weniger stark in der *SUVH2*-oe-Linie reprimiert als im WT. Des Weiteren ist erkennbar, dass es kaum zu Veränderungen der Expressionsniveaus in reifen (NS) Blättern des WTs und der *SUVH2*-oe-Linie kommt.

Alle im WT verstärkt exprimierten Gene (SURFs) sind den Clustern 2, 3, 4 und 5 zugeordnet (Abb. III-26; aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4c-f). Die Unterschiede dieser vier Cluster basieren auf den Expressionsprofilen der Gene in der *SUVH2*-oe-Linie im NS-Stadium und/oder im S1-Stadium verglichen zur Expression im WT. 162 Gene, mehr als 50 % aller im WT identifizierten SURFs, gruppieren in Cluster 4. Wie der orange gekennzeichnete Mittelwert des Clusterprofils zeigt (Abb. III-26), enthält dieses Cluster Gene, die ein ähnliches Expressionsverhalten in den beiden untersuchten Stadien in der *SUVH2*-oe-Linie verglichen mit dem WT haben. Über 28%, der im WT als SURFs identifizierten Gene sind den Clustern 2 und 3 zugeordnet. Für beide Cluster ist eine offensichtliche Repression der Induktion der Gene in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz im Vergleich zum WT charakteristisch. Jedoch ist für die insgesamt 47 Gene, die in Cluster 2 zusammengefasst sind (Abb. III-26; aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4c) typisch, dass sie ein mit dem WT vergleichbares Expressionsniveau im Kontrollstadium (NS) aufweisen und die Expressionsstärke im S1-Stadium deutlich im Vergleich zum WT erniedrigt ist. Interessanterweise ist eine große Anzahl von Genen, die für TFs der WRKY-, NAC-, C2H2- und AP2-EREBP-Familie kodieren, diesem Cluster zugehörig (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4c). Auch das bereits in vorigen Analysen untersuchte und für den WRKY53-TF kodierende Gen AT4G23810 ist diesem Cluster zugeordnet. Im Gegensatz zu den in Cluster 2 gruppierten Genen, sind die Expressionsniveaus der 41 in Cluster 3 zugeordneten Gene im seneszenten S1-Stadium mit denen des WTs im S1-Stadium vergleichbar. Allerdings wie durch den farbig hervorgehobenen Mittelwert in Abbildung III-26 erkennbar wird, ist das Expressionsniveau im Kontrollstadium (NS) bereits deutlich im Vergleich zum WT im NS-Stadium erhöht. So ergibt sich zwar eine deutliche Reduktion der seneszenzabhängigen Induktion der Expression, allerdings verursacht durch einen bereits im NS-Stadium erhöhten Transkriptgehalt im Vergleich zum WT. Dieser Effekt der *SUVH2*-Überexpression auf die Expression von SAGs konnte bereits für die untersuchten Seneszenzmarkergene *SAG12*, *FRK1* sowie *MYB13* festgestellt werden (s. Kapitel III.4.3.1). Weitere 64 der 314 im WT identifizierten SURFs, sind dem Cluster 5 zugeordnet (Abb. III-26; aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS* 4f). Dieses Cluster ist

durch mehr oder weniger stark erniedrigte Expressionsniveaus in beiden untersuchten Stadien der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT gekennzeichnet.

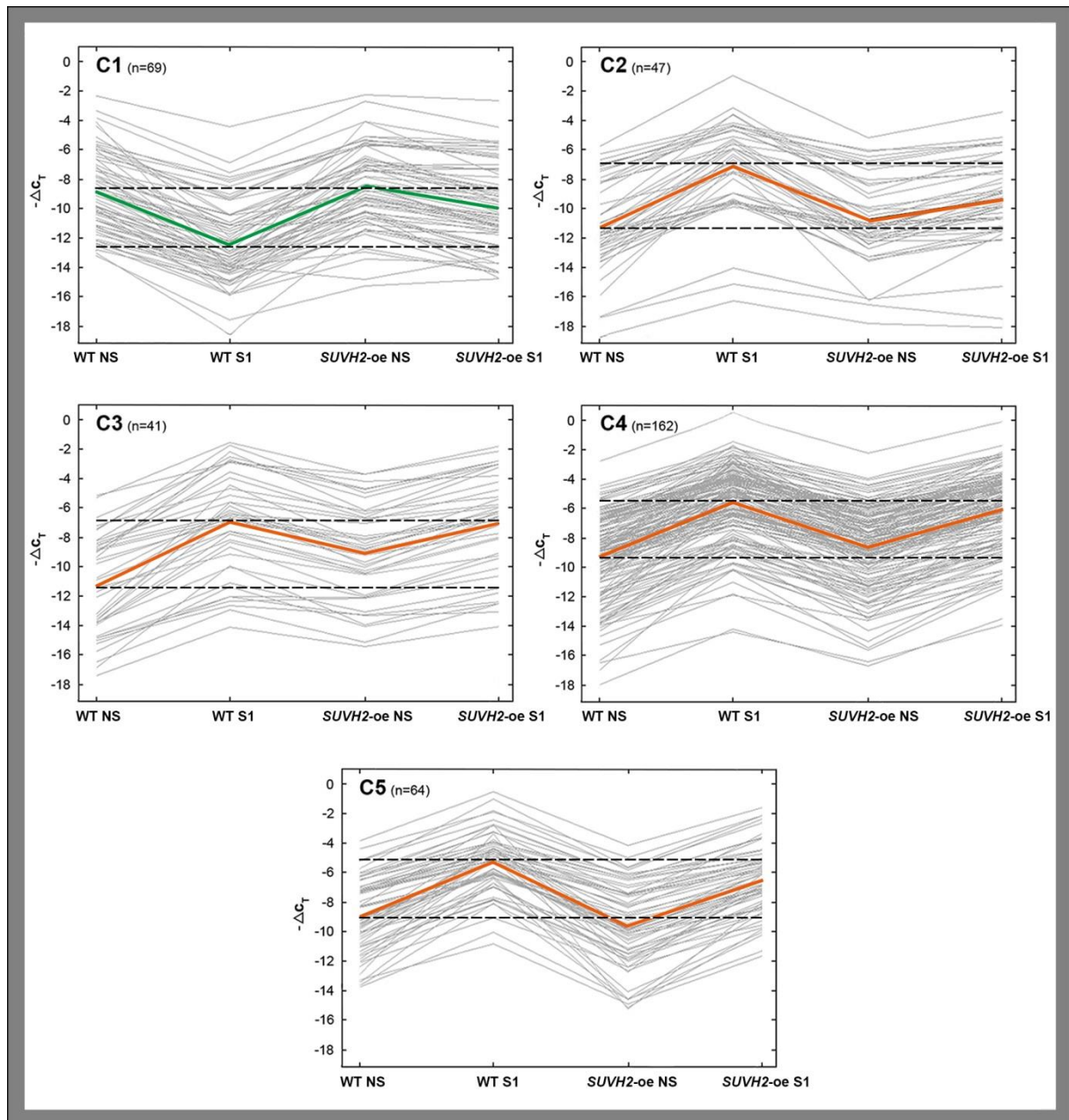


Abbildung III-26: *k*-Means Clusteranalysen der im WT seneszenzabhängig regulierten Faktoren (SARFs). Die Clusteranalysen erfolgten anhand der normalisierten Daten des NS- und S1-Stadiums für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie unter Verwendung des *k*-Means Algorithmus (mit Pearson Korrelation) zwischen den 383 im WT differenziell regulierten Genen. Die Y-Achse zeigt die $-\Delta C_T$ -Werte und spiegelt die Herauf- bzw. Herunterregulation der Gene wider. Die X-Achse gibt die miteinander verglichenen Entwicklungsstadien entweder für den WT oder die *SUVH2*-oe-Linie an. Der Mittelwert eines Clusters ist als dicke farbige Linie gezeigt (grün: alle SDRFs; orange: alle SURFs). (n) gibt die Anzahl der Gene an, die einem Cluster zugeordnet wurden.

Zusammenfassend bestätigen die Clusteranalysen, dass mehr als die Hälfte der 314 im WT identifizierten SURFs keine starke Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch die *SUVH2*-Überexpression aufweisen. Jedoch konnte für das Expressionsprofil der Gene, die den Clustern 2, 3, und 5 zugeordnet sind, ein deutlicher Effekt auf die Expression durch die Überexpression von *SUVH2* festgestellt und weiter aufgeschlüsselt werden. Dabei wurde deutlich, dass die Expression einiger Gene bereits in reifen Blättern beeinflusst ist, während

die anderer nur oder auch im S1-Stadium eine Veränderung zeigte. Zusätzlich ist durch die Clusteranalysen ersichtlich, dass die Expressionsprofile der 69 im WT herunterregulierten SDRFs im nicht seneszenten NS-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie ähnlich sind. Jedoch ist für die Mehrzahl dieser Gene charakteristisch, dass die Repression während der Seneszenz im WT in der *SUVH2*-oe-Linie deutlich vermindert ist.

III.5.6 Detaillierte Expressionsanalysen ausgewählter Kandidatengene der Cluster 2, 3 und 5.

Die Clusteranalysen ergaben, dass die Expressionsmuster der SURFs, die den Clustern 1, 2, 3 und 5 zugeordnet wurden, durch die Überexpression der putativen Histonmethyltransferase *SUVH2* deutlich im Vergleich zum WT verändert sind (s. Kapitel III.5.5). Damit stellen diese Gene potentielle Ziele regulatorischer Chromatinveränderungen während der Seneszenz dar.

III.5.6.1 Detaillierte Expressionsanalysen von Kandidatengenen aus Cluster 2.

Durch ChIP-Analysen an drei Seneszenzmarkergenen konnten insbesondere für *WRKY53* spezifische Chromatinveränderungen während der Seneszenz in WT- und *SUVH2*-Überexpressionspflanzen nachgewiesen werden (s. Kapitel III.3.2 und III.4.4.2.3). *WRKY53* selbst zeigte in den qRT-PCR-Plattformanalysen ein für das Cluster 2 charakteristisches Expressionsprofil. Um gezielt weitere solcher Gene aus dem großen Set, möglicher durch Chromatinveränderungen regulierter Gene, zu identifizieren, wurden die zehn Gene aus Cluster 2 ausgewählt, die die stärkste Suppression der seneszenzspezifischen Induktion in der *SUVH2*-oe-Linie aufwiesen (Tab. III.3). Diese zehn sog. Top-Kandidatengene sollten nachfolgend hinsichtlich ihres Expressionsprofils in einer detaillierten Seneszenzkinetik des WTs sowie der *SUVH2*-oe-Linie untersucht werden.

Index	GEN-ID	FAMILIE	ANNOTATION	WT NS/S1			<i>SUVH2</i> -oe NS/S1			WT NS / <i>SUVH2</i> -oe NS			WT S1 / <i>SUVH2</i> -oe S1		
				$\Delta\Delta\text{CT}$ (NS - S1)			$\Delta\Delta\text{CT}$ (NS - S1)			$\Delta\Delta\text{CT}$ NS (WT NS - <i>SUVH2</i> -oe NS)			$\Delta\Delta\text{CT}$ S1 (WT S1 - <i>SUVH2</i> -oe S1)		
				MW	SA	FC	MW	SA	FC	MW	SA	FC	MW	SA	FC
1	AT5G64530	NAC	ANAC104	-5,3	1,0	39,0	-1,9	0,9	3,7	0,4	0,6	0,8	3,8	1,1	0,1
2	AT5G43170	C2H2	AZF3	-5,2	0,5	36,1	-1,6	0,2	3,0	0,1	0,3	0,9	3,7	0,4	0,1
3	AT2G40750	WRKY	WRKY54	-5,2	1,7	35,8	-1,6	0,9	3,0	0,1	0,4	0,9	3,7	1,2	0,1
4	AT3G56400	WRKY	WRKY70	-4,8	1,1	27,5	-1,7	0,4	3,3	-0,6	0,7	1,5	2,5	1,5	0,2
5	AT5G08790	NAC	ANAC081	-4,5	0,6	22,9	-1,6	1,1	3,0	0,4	0,6	0,7	3,4	1,2	0,1
6	AT3G10590	MYB	keine Zuordnung	-4,3	1,1	19,5	-1,4	1,3	2,6	-0,2	0,7	1,1	2,8	0,5	0,2
7	AT2G37260	WRKY	WRKY44	-4,2	0,4	18,4	-1,0	0,3	1,0	-0,9	0,4	1,9	3,2	0,5	0,1
8	AT2G43500	RWP-RK	keine Zuordnung	-4,2	0,3	17,8	-1,2	2,2	2,3	-0,3	1,6	1,2	2,7	0,4	0,2
9	AT4G34400	AB13VP1	keine Zuordnung	-3,9	1,0	14,5	-1,2	1,8	2,3	-0,3	1,8	1,2	2,4	2,0	0,2
10	AT5G04390	C2H2	keine Zuordnung	-3,7	0,2	13,2	-0,7	0,7	1,6	-0,8	0,4	1,7	2,3	0,6	0,2

Die zehn Gene aus Cluster 2 mit der stärksten Suppression im S1-Stadium von *SUVH2*-oe-Pflanzen wurden aufgrund nachstehender Kriterien für weiterführende Expressionsanalysen in einer Seneszenzkinetik ausgewählt: 1.) $FC_{(WT\ S1/NS)} \geq 4$; 2.) $FC_{(SUVH2-oe\ S1/NS)} < 4$; 3.) $0,5 \leq FC_{(SUVH2-oe\ NS/WT\ NS)} \leq 2$; 4.) $FC_{(SUVH2-oe\ S1/WT\ S1)} < 0,5$; 5.) $FC_{(WT\ S1/NS)}$ dreimal höher als der $FC_{(SUVH2-oe\ S1/NS)}$. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte ergeben sich wie folgt: $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{S1} (CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}) - \Delta\text{CT}_{NS} (CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}})$; FC ist der *Fold Change* ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$); Die Mittelwerte (MW) mit entsprechender Standardabweichung (SA) zeigen die Daten aus drei unabhängigen biologischen Replikaten der *Expressionsprofiling*-Plattformexperimente.

WRKY53 selbst würde unter den angewendeten Auswahlkriterien (s. Kapitel V.2.6.2) Rang neun einnehmen. Da jedoch bereits das genaue Expressionsprofil für diesen TF im WT und der *SUVH2*-oe-Linie in einer Seneszenzkinetik bestimmt wurde (s. Kapitel III.4.3.1), ist *WRKY53* nicht mit in Tabelle III.3 aufgeführt. Drei der zehn Top-Kandidatengene kodieren ebenfalls für TFs der

WRKY-Familie. Des Weiteren sind unter den Kandidaten je zwei Mitglieder der NAC- und der C2H2-TF-Familien sowie je ein Mitglied der MYB-, RWP-RK- und ABI3VP1-Familie vertreten. Für sechs der zehn Gene wurde bereits eine Funktion innerhalb der Seneszenz (*WRKY54*, *WRKY70*) oder die Induktion der Expression während der Seneszenz in einer oder mehreren globalen Transkriptomanalysen (*AZF3*, *WRKY44*, *ANAC081* und *ANAC104*) gezeigt (Besseau et al. 2012; Buchanan-Wollaston et al. 2005; van der Graaff et al. 2006; Balazadeh et al. 2008; Breeze et al. 2011). Für die restlichen vier Kandidatengene (*AT5G04390*, *AT3G10590*, *AT4G34400* und *AT2G43500*) konnte demnach erstmalig eine seneszenzabhängig gesteigerte Expression für Arabidopsis WT-Pflanzen nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei diesen Genen um neu identifizierte SAGs. Um genauere Informationen über das Expressionsverhalten der ausgewählten Top-Kandidatengene in früheren und späteren Seneszenzstadien zu erhalten, erfolgte die Bestimmung ihrer Expressionsprofile über qRT-PCR in allen definierten Stadien des etablierten Seneszenzsystems für den WT (NS-, S0-, S1- und S2-Stadium) sowie die *SUVH2*-oe-Linie (NS-, S0-, S1-, S2- und S3-Stadium). In Abbildung III-27 sind die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Transkriptgehalte dargestellt. Für alle zehn Gene ist deutlich ein Anstieg der relativen Transkriptmenge in Bezug auf die nicht seneszente Kontrolle (NS) im WT erkennbar. Dabei kommt es tatsächlich jeweils erst im S1-Stadium und nicht im frühen S0-Stadium zu einem Anstieg der detektierten Transkriptmenge. Gleichzeitig konnte für drei der zehn Gene (*WRKY54*, *WRKY70* und *ANAC104*) ein transientes Expressionsprofil, mit einer maximalen Expression im S1-Stadium und einem Absinken im späten S2-Stadium, nachgewiesen werden. Für die restlichen sieben Gene (*AZF3*, *AT5G04390*, *WRKY44*, *AT3G10590*, *ANAC081*, *AT4G34400* und *AT2G43500*) hingegen wurde ein maximaler Transkriptgehalt im späten S2-Stadium detektiert. Des Weiteren ist aus Abbildung III-27 ersichtlich, dass für alle zehn Gene die Expression im S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie deutlich im Vergleich zum WT vermindert ist und so die Analysen der *Expressionsprofiling*-Plattform bestätigen. Zusätzlich zeigte sich, dass auch in späteren Seneszenzphasen die Transkriptgehalte aller Gene im Vergleich zum WT deutlich erniedrigt sind. Selbst im späten S3-Stadium ist die Expression, mit Ausnahme von *ANAC104* und *AT2G43500* deutlich geringer als im physiologisch vergleichbaren S2-Stadium des WTs. Die stärkste Suppression der seneszenzabhängigen Induktion konnte dabei für *AT5G04390*, *WRKY44*, *AT3G10590* sowie *ANAC081* festgestellt werden.

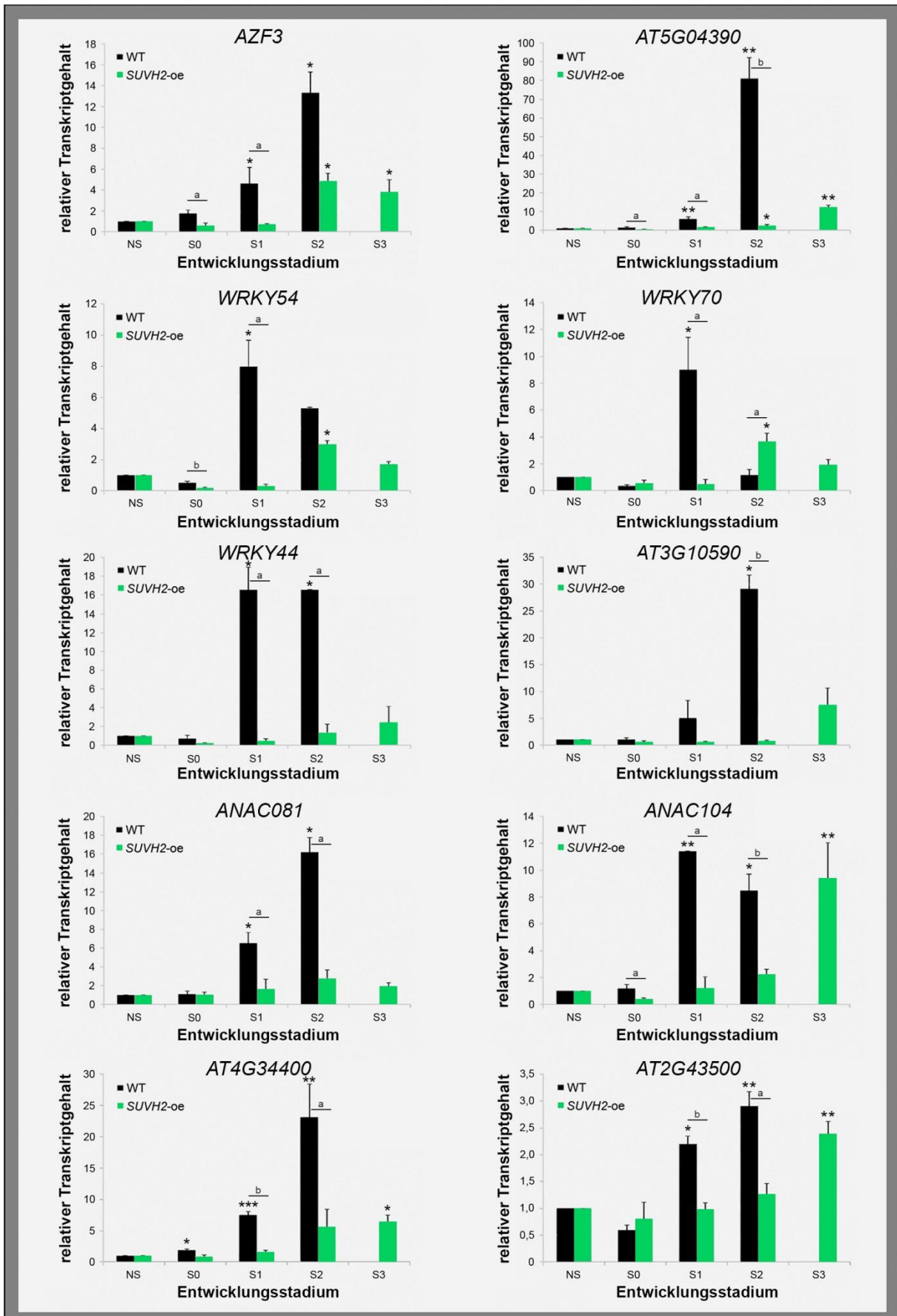


Abbildung III-27: Expressionsprofile der zehn Cluster 2 Top-Kandidatengene in WT und *SUVH2-oe*-Pflanzen. Die Expressionsanalysen der zehn Top-Kandidatengene aus Cluster 2 (aufgelistet in Tabelle III.3) erfolgten mittels qRT-PCR an RNA, die aus Blatt 5–8 von WT- und *SUVH2-oe*-Pflanzen extrahiert wurde. Gezeigt sind die Expressionsmuster für die fünf definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 (WT: schwarze Balken; *SUVH2-oe*: grüne Balken). Die relativen Transkriptgehalte wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet und wurden dabei jeweils auf das Referenzgen *18S* rRNA (AT2G01010) normalisiert. Die Transkriptgehalte sind in reifen Blättern eins (= 100%) gesetzt. Die Balken repräsentieren

jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten und sind mit den entsprechenden Standardabweichungen gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) bzw. zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch Sternchen bzw. Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$ (*); a), $p < 0,01$ (**).

III.5.6.2 Detaillierte Expressionsanalysen von Kandidatengen aus Cluster 3 und 5.

Neben den in Cluster 2 gruppierten Kandidatengen, bei denen es spezifisch im S1-Stadium zu einer Repression durch die *SUVH2*-Überexpression kommt, zeigten auch die den Clustern 3 und 5 zugeordneten Gene interessante Expressionsmuster in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen (s. Kapitel III.5.5). Dabei war für das Cluster 3 ein Expressionsprofil charakteristisch, bei dem die Expression der Gene im NS-Stadium der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT deutlich erhöht war. Im Gegensatz dazu wurden Gene mit einer tendenziell niedrigeren Expression in beiden untersuchten Stadien in der *SUVH2*-oe-Linie dem Cluster 5 zugeordnet. Für beide Cluster wurde je ein Kandidatengen (Cluster 3: *ORA47*, kodiert für einen AP2-EREBP-TF; Cluster 5: *MYB75*, kodiert für den MYB-TF PAP1) für die Bestimmung ihrer Expressionsprofile in allen definierten Stadien des etablierten Seneszenzsystems für den WT (NS-, S0-, S1- und S2-Stadium) sowie für die *SUVH2*-oe-Linie (NS-, S0-, S1-, S2- und S3-Stadium) ausgewählt. In Abbildung III-28 sind die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Transkriptgehalte dargestellt. Dabei ist aus der Einzelbetrachtung der Expressionskinetiken jeder Linie zu erkennen (linke Seite der Abb. III-28), dass die Expression beider Gene im WT deutlich stärker seneszenzabhängig induziert wird als in der *SUVH2*-oe-Linie. Betrachtet man jedoch die Expression im WT und der *SUVH2*-oe-Linie einzeln für jedes Entwicklungsstadium und vergleicht diese miteinander (rechte Seite der Abb. III-28), zeigen sich die für die Cluster typischen Charakteristika. So ist für *ORA47* (Cluster 3) erkennbar, dass die Expression in reifen Blättern (NS-Stadium) in *SUVH2* überexprimierenden Blättern wesentlich höher ist als im korrespondierenden Stadium des WTs. Die vergleichenden Analysen zeigen weiter, dass die detektierten Transkriptmengen in allen vier untersuchten Seneszenzstadien mit denen des WTs vergleichbar sind. Für *ORA47* wird demnach einerseits deutlich, dass die seneszenzabhängige Induktion der Genexpression in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen fast vollständig ausbleibt, das jedoch andererseits bereits in reifen Blättern Transkriptmengen vorhanden sind wie sie im WT erst während der Seneszenz gebildet werden. Das Expressionsprofil von *MYB75* hingegen zeigt das für das Cluster 5 typische Muster. So ist in Abbildung III-28 (rechte Seite) deutlich zu erkennen, dass die Transkriptgehalte sowohl im reifen als auch allen untersuchten seneszenten Stadien deutlich reduziert im Vergleich zum WT sind. Einzig in Blättern des sehr späten S3-Stadiums konnten in der *SUVH2*-oe-Linie ähnliche Gehalte der *MYB75* mRNA detektiert werden wie in Blättern des physiologisch korrespondierenden S2-Stadiums des WTs.

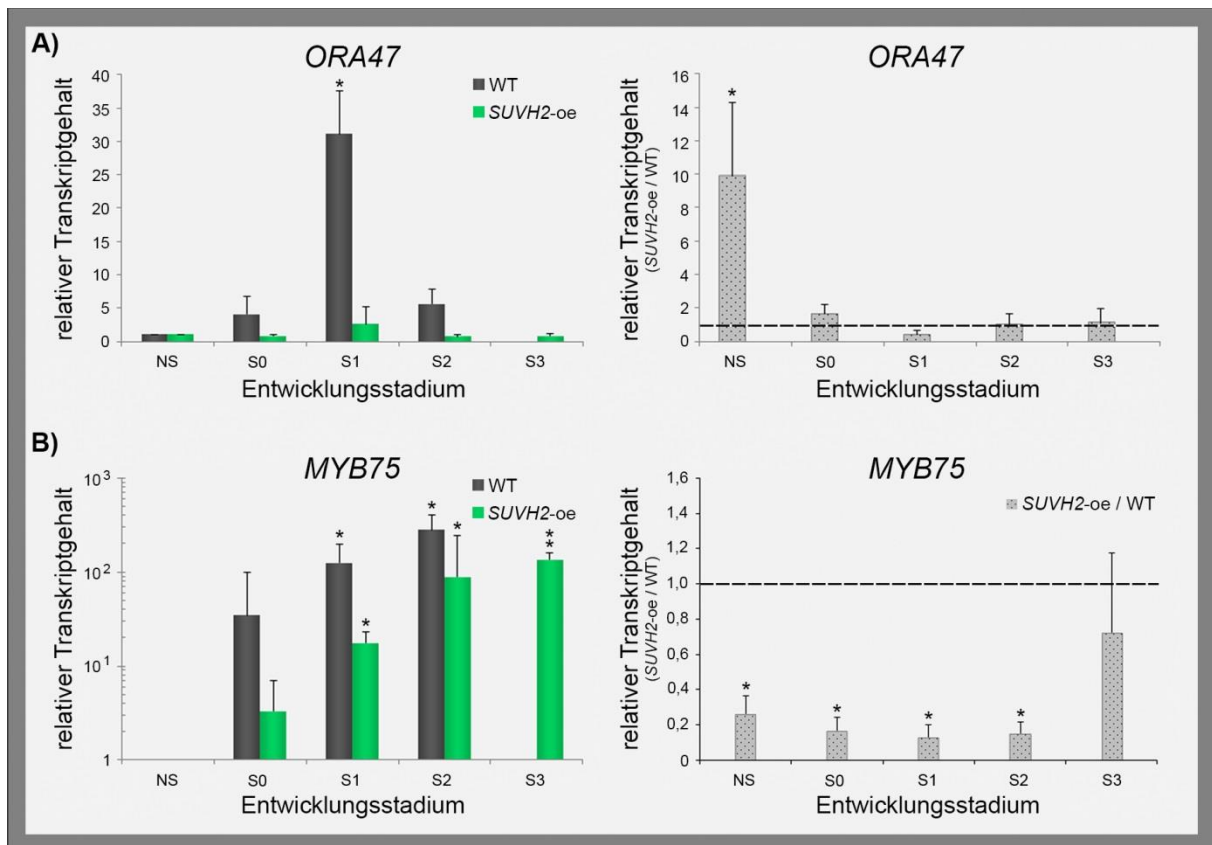


Abbildung III-28: Expressionsprofile der zwei Cluster 3 und 5 Kandidatengene in WT und *SUVH2-oe*-Pflanzen. Die Expressionsanalysen der zwei Kandidatengene (A) Cluster 3: *ORA47* und (B) Cluster 5: *MYB75* erfolgten mittels qRT-PCR an RNA, die aus Blatt 5–8 von WT- und *SUVH2-oe*-Pflanzen extrahiert wurde. Linke Seite: Gezeigt sind die Expressionsmuster für die fünf definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 (WT: schwarze Balken; *SUVH2-oe*: grüne Balken). Die Berechnung der relativen Transkriptgehalte erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Die Transkriptgehalte wurden dabei jeweils auf das Referenzgen *18S* rRNA (*AT2G01010*) normalisiert und sind in reifen Blättern eins (= 100%) gesetzt. Rechte Seite: Vergleichende qRT-PCR-Analysen der zwei Kandidatengene der korrespondierenden Entwicklungsstadien sind durch das Verhältnis der normalisierten Expressionsdaten der *SUVH2-oe*-Linie bezogen auf die des WT's gezeigt. Die Expressionsdaten des S3-Stadiums in der *SUVH2-oe*-Linie wurde dabei auf die Daten des WT's im S2-Stadium bezogen. Die graue gestrichelte Linie kennzeichnet eine gleiche Transkriptmenge im WT und der *SUVH2-oe*-Linie im jeweiligen Entwicklungsstadium (Quotient = 1). Darüber liegende Werte bedeuten eine in der *SUVH2-oe*-Linie verstärkte Expression, bzw. darunter liegende Werte eine geringere Expression im jeweiligen Stadium im Vergleich zum WT. Die Balken repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten und sind mit den entsprechenden Standardabweichungen (dünne Fehlerbalken) gezeigt. Die Expressionsdaten für *MYB75* (linke Seite) sind logarithmisch aufgetragen. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) bzw. zwischen dem WT und der *SUVH2-oe*-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch Sternchen gekennzeichnet [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)].

Zusammenfassend konnten die Daten der *Expressionsprofiling*-Plattformanalysen für die ausgewählten Kandidatengene bestätigt und erweitert werden. So zeigte sich für die Cluster 2 und 5 zugehörigen Gene, dass die festgestellte Repression der seneszenzabhängigen Steigerung der Expression auch in späteren Seneszenzphasen mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Insbesondere die am stärksten durch die *SUVH2*-Überexpression reprimierten Gene sowie die dem Cluster 3 zugeordneten Gene, deren Expression bereits im NS-Kontrollstadium deutlich im Vergleich zum WT erhöht ist, stellen geeignete Kandidaten für zukünftige Analysen der lokalen Chromatinumgebung während der Seneszenz dar.

III.5.7 HY5 als möglicher *upstream* Regulator von SARFs in der Seneszenz.

Shin et al. (2013) präsentierten kürzlich Ergebnisse, die eine Rolle des bZIP-TFs HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5) als übergeordneten (*upstream*) Regulator der *MYB75*-Expression

durch die direkte Bindung an G- und ACE-*cis* Elemente des *MYB75* Promotors postulieren lassen. Zudem konnten in einem ChIP-Chip-Ansatz von Lee et al. (2007) über 3800 putative Zielgene des HY5-TFs identifiziert werden. Interessanterweise wurden dabei auch drei der TOP 10 Kandidatengene aus Cluster 2 (*ANAC081*, *ANAC104* und *WRKY44*) sowie *WRKY53* als HY5-Zielgene identifiziert. Dies führte zu der These, dass HY5 neben seinen beschriebenen Funktionen als wichtiger Regulator in Entwicklungs- und Photomorphogeneseprozessen (Koornneef und van der Veen 1980; Osterlund et al. 2000; Chen et al. 2013; Lee et al. 2007) ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der Kontrolle der seneszenzspezifischen Expression von SARFs haben könnte. Daher erfolgte ein Vergleich, der im TF-*Profiling*-Ansatz identifizierten SARFs, mit den Daten von Lee et al. (2007). 125 der 383 SARFs, für die eine signifikante Veränderung der Genexpression in der Seneszenz im WT gezeigt werden konnte, wurden ebenfalls als HY5-Zielgene identifiziert (Abb. III-29; aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 4a*). Des Weiteren wurde verglichen, wie sich der Anteil der möglichen HY5-Zielgene an den SARFs im Verhältnis zum gesamten Genset, das in dem TF-*Profiling* untersucht wurde, verhält. In Abbildung III-29 ist zu erkennen, dass von den 773 im WT nicht seneszenzabhängig regulierten Genen, 190 TF (~25%) als HY5-Zielgene in den Versuchen von Lee et al. (2007) identifiziert wurden. Demgegenüber stehen die etwa 33% der SARFs, die als putative HY5-Zielgene identifiziert wurden.

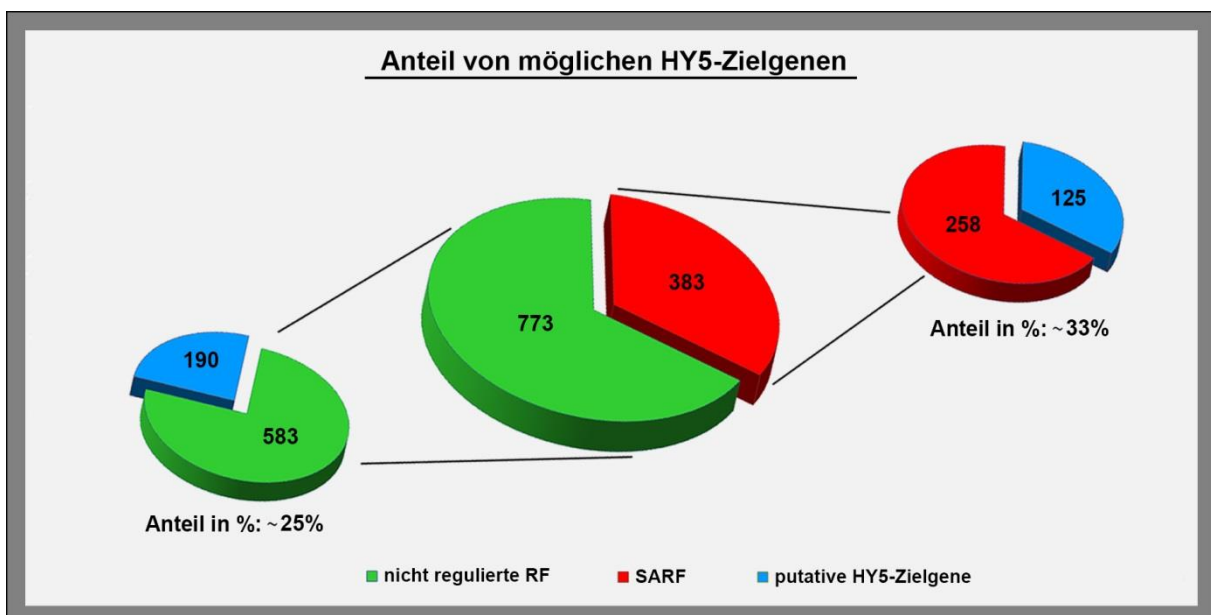


Abbildung III-29: Vergleich des Anteils putativer HY5-Zielgene an seneszenzabhängig regulierten Genen (SARFs) und nicht seneszenzabhängig regulierten Genen. Die Anteile in Zahlen sind in Form von Tortendiagrammen sowie in Prozent (%) abgebildet. (RF) regulatorischer Faktor.

Folglich sind insbesondere solche Gene, die eine gesteigerte Expression während der Seneszenz aufweisen, mögliche HY5-Zielgene. Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Funktion des HY5-TFs innerhalb der Regulation der Genexpression von etwa einem Drittel der als SARFs identifizierten Faktoren hin. Interessanterweise konnte in den *Expressionsprofiling*-Ansätzen festgestellt werden, dass die *HY5* Genexpression selbst seneszenzabhängig induziert ist (s. Ay et al.

2014b; *Supplementary DS 2a*). Weiterhin zeigten die Expressionsanalysen eine deutliche Repression der Genexpression im S1-Stadium für die SUVH2 überexprimierenden Pflanzen, was sich in der Zuordnung von *HY5* in Cluster 2 widerspiegelt (s. Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 4c*). Nachfolgend wurde untersucht, wie sich die Genexpression von *HY5* innerhalb der erweiterten Seneszenzkinetik verhält und ob die SUVH2-Überexpression *HY5* auch in anderen Seneszenzstadien beeinflusst. Mittels qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der relativen Transkriptgehalte für die vier (WT: NS, S0, S1 und S2) bzw. fünf (*SUVH2*-oe: NS, S0, S1, S2 und S3) definierten Entwicklungsstadien. Wie in Abbildung III-30 zu erkennen, konnte der Anstieg der detektierten Transkriptmengen in der Seneszenz für den WT bestätigt werden. Weiterhin zeigt *HY5* ein akkumulierendes Expressionsmuster, d. h. die relativen Transkriptmengen steigen im späten S2-Stadium weiter an. Des Weiteren ist erkennbar, dass die Induktion der Genexpression von *HY5* in der *SUVH2*-oe-Linie in allen untersuchten Seneszenzstadien deutlich schwächer als im WT ausgeprägt ist.

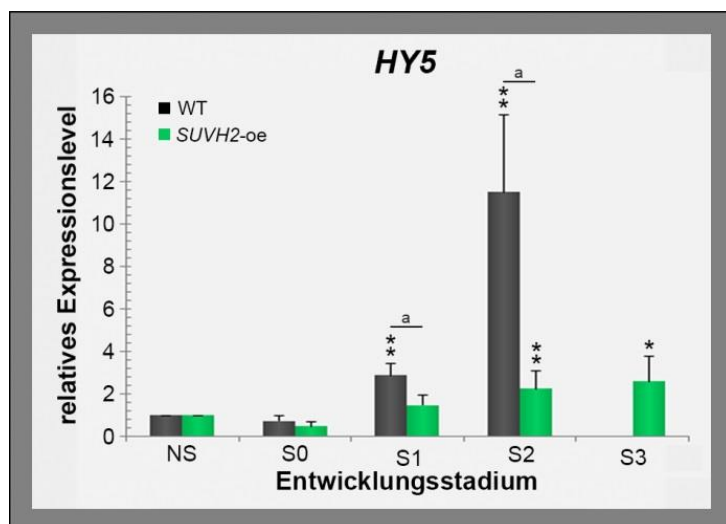


Abbildung III-30: Expressionsprofil von *HY5* in WT- und *SUVH2*-oe-Pflanzen.

Die Expressionsanalysen erfolgten mittels qRT-PCR. Gezeigt sind die Expressionsmuster für die fünf definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 (WT: schwarze Balken; *SUVH2*-oe: grüne Balken). Die relativen Transkriptgehalte wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2) berechnet. Die Transkriptgehalte sind auf die Transkriptgehalte der *18S* rRNA normalisiert und in reifen Blättern eins (= 100%) gesetzt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten und sind mit den entsprechenden Standardabweichungen gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test) zwischen den analysierten Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) bzw. zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch Sternchen bzw. Buchstaben gekennzeichnet [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)].

III.5.8 EAR-Motiv kodierende SARFs in der Seneszenz.

Eine weitere Auffälligkeit unter den Top 10 Kandidatengenen aus Cluster 2 war, dass zwei dieser Gene (AT5G04390 und AT5G43170), die für TFs der C2H2-Familie kodieren, ein sog. EAR-Motiv (*Ethylene-responsive element-binding factor-associated amphiphilic repression*-Motiv) enthalten. Kagale et al. (2010) identifizierten in einer genomweiten bioinformatischen Analyse 219 regulatorische Proteine in Arabidopsis, die ein solches EAR-Motiv besitzen. Das EAR-Motiv ist das häufigste transkriptionelle Repressormotiv, das bislang in Pflanzen identifiziert wurde (Kagale und Rozwadowski 2011). Um herauszufinden, ob insbesondere EAR-Motiv kodierende TFs seneszenzabhängig reguliert sind und ob die Überexpression von SUVH2 die Expression solcher Gene beeinflusst, wurde verglichen wie sich der Anteil EAR-Motiv kodierender Gene an den SARFs im Vergleich zum gesamten TFs-Set verhält. In Abbildung III-31 ist zu erkennen, dass von den 773 im WT nicht seneszenzabhängig regulierten Genen, 83 TF (~11%) als EAR-Motiv

kodierende Gene durch Kagale et al. (2010) identifiziert wurden. Demgegenüber konnten 47 der 383 seneszenzabhängig regulierten Gene (~12%) als EAR-Motiv kodierende Gene identifiziert werden (aufgelistet in Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 4a*). Ergo zeigte sich keine Häufung für EAR-Motiv kodierenden Gene unter den seneszenzabhängig regulierten Faktoren. Allerdings konnte für den Großteil der 47 EAR-Motiv kodierenden SARFs ein im Vergleich zum WT verändertes Expressionsmuster in der *SUVH2*-Überexpressionslinie festgestellt werden. Dies wird im nächsten Abschnitt genauer diskutiert.

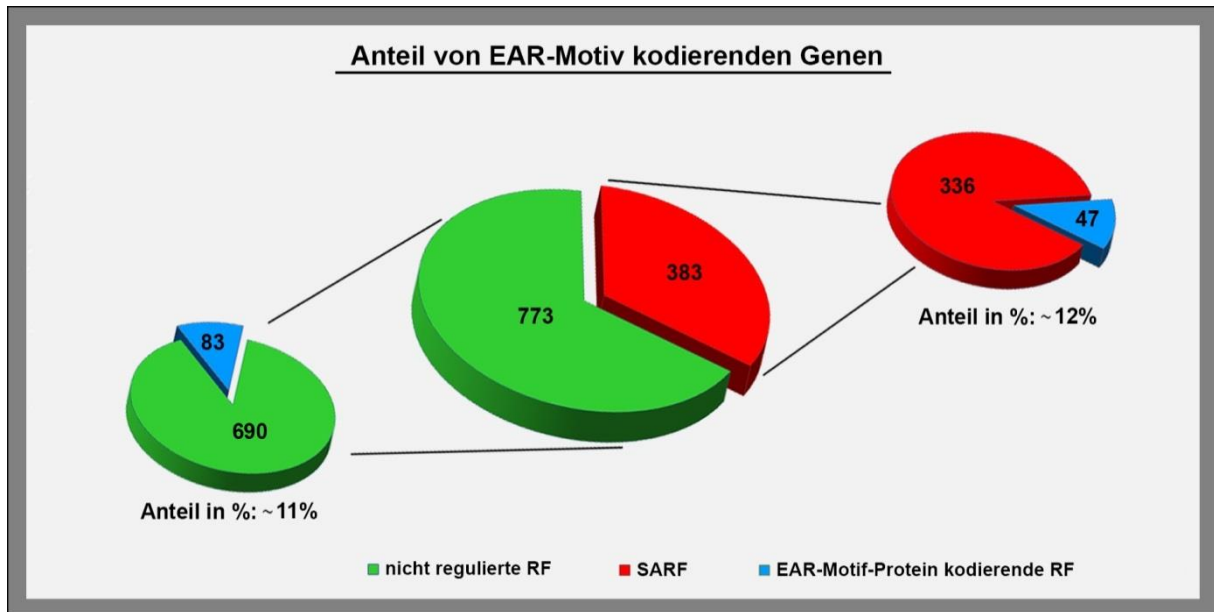


Abbildung III-31: Vergleich des Anteils EAR-Motiv kodierender Gene an seneszenzabhängig regulierten Genen (SARFs) und nicht seneszenzabhängig regulierten Genen. Die Anteile in Zahlen sind in Form von Tortendiagrammen sowie in Prozent (%) abgebildet. (RF) regulatorischer Faktor.

III.5.9 Analyse der Verteilungsmuster von HY5-Zielgenen sowie EAR-Motiv kodierenden Genen unter den seneszenzabhängig regulierten Faktoren sowie der Einfluss der SUVH2-Überexpression.

Im Folgenden wurde untersucht, ob es zu Häufungen im Vorkommen der putativen HY5-Zielgene und den EAR-Motiv kodierenden Faktoren unter den SARFs hinsichtlich der identifizierten Cluster oder bestimmter Genfamilien kommt. Zunächst wurden die Cluster 1 bis 5 genauer betrachtet. In Tabelle III.4 ist die Gesamtzahl der zugeordneten SARFs im Vergleich zu der Anzahl für HY5-Zielgene bzw. EAR-Motiv kodierenden Gene aufgeführt.

Tabelle III.4. Verteilungsmuster der 383 SARFs innerhalb der Cluster C1-C5, die entweder für putative HY5-Zielgene oder EAR-Motiv enthaltende Proteine kodieren.

Cluster	N	n (HY5-ZG)	Anteil in % (n / N * 100%)	n (EAR-Motiv)	Anteil in % (n/N * 100%)
1	69	13	18,8	8	11,6
2	47	14	29,8*	7	14,9*
3	41	14	34,1*	7	17,1*
4	162	62	38,3*	16	9,9
5	64	22	34,4*	9	14,1*

Die Verhältnisse von putativen HY5-Zielgenen bzw. EAR-Motiv kodierenden Genen (n) zu der Gesamtzahl der Gene eines Clusters (N) sind prozentual dargestellt. (ZG) Zielgen. Sternchen (*) kennzeichnen Werte in Prozent (%) die über dem Durchschnitt liegen, der für die nicht seneszenzabhängig regulierten Gene bestimmt wurde (Abb. III-29 und III-31).

Dabei ist für die HY5-Betrachtung auffällig, dass insbesondere die Cluster 2 bis 5 einen hohen Anteil putativer Zielgene enthalten. Dagegen finden sich deutlich weniger Zielgene für HY5 (~19%) unter den Cluster 1 zugeordneten SDRFs. Das bedeutet, dass gehäuft HY5-Zielgene in Clustern der im WT induzierten Gene (SURFs) gefunden wurden. Dabei sind ähnliche Verteilungen für alle vier Cluster feststellbar. Für die Analyse der EAR-Motiv kodierenden Gene (Tab. III.4) stellte sich hingegen heraus, dass insbesondere die Cluster 2, 3 und 5 eine höhere Anzahl (>14%) solcher Gene enthalten als Cluster 1 (~12%) und 4 (~10%) sowie die nicht seneszenzabhängig regulierten Gene (~11%; s. Abb. III-31). In diesen Clustern sind insbesondere Gene eingruppiert, die ein verändertes Expressionsmuster in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen aufwiesen. Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Genfamilien und dem Vorkommen möglicher HY5-Zielgene sowie den EAR-Motiv kodierenden Faktoren sind in Tabelle III.5 aufgeführt.

Tabelle III.5. Verteilungsmuster der für HY5-Zielgene oder EAR-Motiv kodierenden SARFs innerhalb der untersuchten Genfamilien mit regulatorischer Funktion.

Familie	Σ alle SARF /	Σ alle	Σ alle	Σ alle	Σ alle	Σ alle	Σ alle	Σ alle	Σ alle
	Σ alle detektierten RF /	detektierten RF	SARF	detektierten RF	SARF	detektierten RF	SARF	detektierten RF	SARF
		HY5-ZG	HY5-ZG	HY5-ZG in %	HY5-ZG in %	EAR	EAR	EAR in %	EAR in %
ABI3/VP2	11 / 23	4	3	17	27	3	1	13	9
AP2/EREBP	38 / 84	41	17	49	45	9	6	11	16
ARF	2 / 15	6	1	40	50	0	0	0	0
AS2 (LOB)	4 / 15	2	1	13	25	2	0	13	0
Aux/IAA	4 / 22	5	1	23	25	22	4	100	100
bHLH	27 / 101	28	7	28	26	0	0	0	0
bZIP	22 / 55	15	8	27	36	3	0	5	0
C2C2(Zn) CO-like	3 / 22	14	3	64	100	2	0	9	0
C2C2(Zn) DOF	8 / 26	6	1	23	13	1	1	4	13
C2C2(Zn) GATA	9 / 24	8	2	33	22	0	0	0	0
C2H2	23 / 86	13	6	15	26	27	15	31	56
C3H	7 / 25	10	3	40	43	0	0	0	0
CCAAT-HAP5	2 / 10	2	0	20	0	0	0	0	0
GARP-G2-like	5 / 32	8	0	25	0	4	1	13	20
GeBP	5 / 11	1	0	9	0	0	0	0	0
GRAS	8 / 28	10	3	36	38	0	0	0	0
HB	15 / 64	19	5	30	33	22	6	34	40
HMG	4 / 10	4	1	40	25	0	0	0	0
HSF	6 / 17	5	4	29	67	4	1	24	17
MADS	13 / 43	6	3	14	23	13	5	30	38
MYB	33 / 98	26	10	27	30	8	2	8	6
MYB-related	7 / 32	12	3	38	43	0	0	0	0
NAC	40 / 59	20	15	34	38	1	1	2	3
SBP	1 / 14	1	0	7	0	3	0	21	0
TCP	3 / 21	7	3	33	100	0	0	0	0
Tify	4 / 10	4	2	40	50	3	3	30	75
Tribeliox	3 / 15	6	1	40	33	0	0	0	0
WRKY	27 / 46	17	9	37	33	0	0	0	0

Es sind jeweils die Anzahl sowie der Anteil (in Prozent %) putativer HY5-Zielgene bzw. EAR-Motiv kodierender Gene an den regulierten SARFs einer Familie bzw. an der Gesamtzahl der detektierten Gene einer Familie gezeigt. Rot hervorgehoben sind Werte, deren prozentualer Anteil deutlich über dem, der in Abb. III-29 bzw. III-31 berechneten Werte für das Vorkommen von HY5-Zielgenen bzw. EAR-Motiv kodierenden Genen, liegt. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für Genfamilien, für die im TF-Profiling mindestens zehn Mitglieder detektiert werden konnten. (Σ) Summe. (RF) Regulatorischer Faktor. (ZG) Zielgen. (SARF) seneszenzassoziierter regulatorischer Faktor. (EAR) *Ethylene-responsive element-binding factor-associated amphiphilic repression*.

Dabei ist für die HY5-Zielgene augenscheinlich, dass insbesondere in den AP2-EREBP-, bZIP-, C3H-, GRAS-, NAC- und WRKY-Familien gehäuft HY5-Zielgene sowohl im gesamten untersuchten Genset als auch in der Gruppe der SARFs zu finden sind. Bezüglich der EAR-Motiv kodierenden Gene konnte hingegen festgestellt werden, dass diese insbesondere in den Familien der AP2-EREBP-, Aux/IAA, C2H2-, HB- und MADS-TFs sowohl im gesamten untersuchten Genset als auch in der Gruppe der SARFs gehäuft sind. Weiterhin wurde untersucht, ob die

Überexpression von SUVH2 einen spezifischen Einfluss auf TF-Familien hat, für die eine Häufung von HY5-Zielgenen oder EAR-Motiv kodierenden Genen festgestellt wurde. Dazu wurde der Anteil der Gene bestimmt, für die eine veränderte Expression in der *SUVH2*-oe-Linie in mindestens einem der beiden untersuchten Stadien (NS und S1) festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse für die relevanten TF-Familien sind bezüglich der HY5-Zielgene in Tabelle III.6 und bezüglich des EAR-Motivs in Tabelle III.7 zusammengefasst.

Tabelle III.6. Der Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Expression der putativen HY5-Zielgene unter den SARFs.

Familie	Σ alle SARF /	Σ alle	Σ alle	Σ alle
	Σ alle detektierten RF /	detektierten RF	SARF	verändert exprimiert
		HY5-ZG	HY5-ZG	in <i>SUVH2</i> -oe
ABI3/VP2	11 / 23	4	3	2
AP2/EREBP	38 / 84	41	17	14
ARF	2 / 15	6	1	0
AS2 (LOB)	4 / 15	2	1	1
Aux/IAA	4 / 22	5	1	1
bHLH	27 / 101	28	7	2
bZIP	22 / 55	15	8	3
C2C2(Zn) CO-like	3 / 22	14	3	0
C2C2(Zn) DOF	8 / 26	6	1	0
C2C2(Zn) GATA	9 / 24	8	2	1
C2H2	23 / 86	13	6	4
C3H	7 / 25	10	3	1
GRAS	8 / 28	10	3	1
HB	15 / 64	19	5	0
HMG	4 / 10	4	1	0
HSF	6 / 17	5	4	1
MADS	13 / 43	6	3	0
MYB	33 / 98	26	10	4
MYB-related	7 / 32	12	3	0
NAC	40 / 59	20	15	7
TCP	3 / 21	7	3	1
Tify	4 / 10	4	2	0
Trihelix	3 / 15	6	1	1
WRKY	27 / 46	17	9	6
Summe	-	288	112	50

Es sind jeweils die Anzahl putativer HY5-Zielgene an den regulierten SARFs einer Familie bzw. an der Gesamtzahl der detektierten Gene einer Familie gezeigt. Weiterhin ist die Anzahl der Mitglieder einer TF-Familie angegeben, die eine signifikant veränderte Expression in der *SUVH2*-oe-Linie in mindestens einem der beiden untersuchten Entwicklungsstadien (NS oder S1) aufweisen. Rot hervorgehoben sind Familien, deren Expressionsverhalten besonders stark in der *SUVH2*-oe-Linie beeinflusst war. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für Genfamilien, für die im TF-Profiling mindestens zehn Mitglieder detektiert werden konnten und für die mindestens ein HY5-Zielgen als SARF identifiziert wurde. (RF) Regulatorischer Faktor. (ZG) Zielgen. (SARF) seneszenzassoziierter regulatorischer Faktor.

Für die HY5-Zielgene stellte sich heraus, dass insbesondere die Familien der AP2-EREBP-, C2H2-, NAC- und WRKY-TFs in der Expression ihrer Vertreter von HY5-Zielgenen durch die *SUVH2*-Überexpression beeinflusst sind. Die stärksten Effekte sind für die AP2-EREBP- und die WRKY-Familie feststellbar. So werden 14 von 17 (über 82%) AP2-EREBP-Mitgliedern sowie sechs von neun (über 66%) WRKY-Mitgliedern, die als HY5-Zielgene identifiziert wurden, in der *SUVH2*-oe-Linie signifikant verändert exprimiert.

Für die EAR-Motiv kodierenden Gene stellte sich heraus, dass insbesondere die Familien der AP2-EREBP-, Aux/IAA-, C2H2- und MADS-TFs in der Expression ihrer Vertreter durch die *SUVH2*-Überexpression beeinflusst sind. Jeweils mindestens 66% der Mitglieder dieser Familien, für die eine Häufung von EAR-Motiv kodierenden Genen gezeigt wurde, sind in der *SUVH2*-oe-Linie signifikant anders exprimiert.

Tabelle III.7. Der Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Expression EAR-Motiv kodierender SARFs.				
Familie	Σ alle SARF / Σ alle detektierten RF	Σ alle detektierten RF EAR	Σ alle SARF EAR	Σ alle verändert exprimiert in <i>SUVH2-oe</i>
ABI3/VP2	11 / 23	3	1	1
AP2/EREBP	38 / 84	9	6	5
Aux/IAA	4 / 22	22	4	3
C2C2(Zn) DOF	8 / 26	1	1	0
C2H2	23 / 86	27	15	10
GARP-G2-like	5 / 32	4	1	0
HB	15 / 64	22	6	1
HSF	6 / 17	4	1	0
MADS	13 / 43	13	5	4
MYB	33 / 98	8	2	0
NAC	40 / 59	1	1	0
Tify	4 / 10	3	3	0
Summe	-	117	46	24

Es sind jeweils die Anzahl EAR-Motiv kodierender Gene an den regulierten SARFs einer Familie bzw. an der Gesamtzahl der detektierten Gene einer Familie gezeigt. Weiterhin ist die Anzahl der Mitglieder einer TF-Familie angegeben, die eine signifikant veränderte Expression in *SUVH2-oe*-Linie in mindestens einem der beiden untersuchten Entwicklungsstadien (NS oder S1) aufweisen. Rot hervorgehoben sind Familien, deren Expressionsverhalten besonders stark in der *SUVH2-oe*-Linie beeinflusst war. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für Genfamilien, für die im *TF-Profiling* mindestens zehn Mitglieder detektiert werden konnten und für die mindestens ein EAR-Motiv kodierendes Gen als SARF identifiziert wurde. (RF) Regulatorischer Faktor. (ZG) Zielgen. (SARF) seneszenzassoziierter regulatorischer Faktor. (EAR) *Ethylene-responsive element-binding factor-associated amphiphilic repression*.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der bZIP-TF HY5 eine wichtige regulatorische *upstream* Komponente in der Regulation insbesondere von TFs, die seneszenzabhängig induziert werden, sein könnte. Interessanterweise ist die Expression von HY5 selbst im WT seneszenzabhängig reguliert. Dabei ist die Induktion der Expression während der Seneszenz in *SUVH2-oe*-Pflanzen supprimiert. Demnach könnte die Expression von HY5 während der Seneszenz über Mechanismen reguliert sein, die die Chromatinstruktur beeinflussen. Weiterhin konnte für einige TF-Familien wie die AP2-EREBP-, C2H2-, NAC- und WRKY-TFs ein hoher Anteil von putativen HY5-Zielgenen, die eine seneszenzabhängige Regulation aufweisen, festgestellt werden. Dabei zeigte sich zudem, dass die Überexpression von SUVH2 insbesondere die Expressionsmuster von AP2-EREBP-, C2H2- und WRKY-TFs beeinflusste. Des Weiteren war auffällig, dass eine große Anzahl von SARFs, die für EAR-Motiv enthaltende Proteine kodieren, eine veränderte Expression in der *SUVH2-oe*-Linie während der Seneszenz aufwies. Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere die Familien der AP2-EREBP-, Aux/IAA-, C2H2- und MADS-TFs in der Expression ihrer Vertreter durch die SUVH2-Überexpression beeinflusst sind.

III.6 Der Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Expression der *SUVH*-Gene während der Seneszenz.

Im Laufe der Arbeit ergab sich als weitere interessante Fragestellung, ob eventuell andere SUVH-Proteine eine Funktion während der Seneszenz haben könnten und ob die erhöhte Expression von *SUVH2* in der *SUVH2-oe*-Linie einen Effekt auf die Transkription solcher Gene hat. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Überexpression von SUVH2 die Expressionsmuster der *SU(VAR)3-9* homologen Gene *SUVH1-SUVH10* während der Seneszenz beeinflusst. Die Bestimmung der Expressionsprofile der zehn *SUVH*-Gene erfolgte in der Seneszenzkinetik sowohl

für den WT als auch die *SUVH2*-oe-Linie. Die Transkripte von *SUVH7* und *SUVH10* konnten in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien für den WT oder die *SUVH2*-oe-Linie nachgewiesen werden. Die Expressionsprofile für *SUVH1-SUVH6* sowie *SUVH8-9* sind in Abbildung III-32 dargestellt. *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH6* und *SUVH9* zeigten keine Veränderung der relativen Transkriptgehalte während der Seneszenz im WT. Darüber hinaus hat die starke Überexpression von *SUVH2* keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene, weder im Kontrollstadium (NS) noch in den untersuchten Seneszenzstadien. Dies wird besonders aus den sehr ähnlichen Δ CT-Werten deutlich, die tabellarisch für jedes Gen und Stadium in Abbildung III-32 mit aufgeführt sind. Im Gegensatz dazu wurde für *SUVH4* und *SUVH5* wie auch für *SUVH2* ein Absinken der relativen Transkriptmenge für den WT während der Seneszenz festgestellt. Jedoch konnte auch für diese Gene kein verändertes Expressionsverhalten in der *SUVH2*-oe-Linie festgestellt werden. Interessanterweise wurde für *SUVH8* als einzigem Vertreter der *SUVH*-Familie im WT ein deutlicher Anstieg der detektierten Transkriptmenge während der Seneszenz nachgewiesen. Dabei war in reifen Blättern (NS-Stadium) kein *SUVH8*-Transkript nachweisbar. Doch bereits im frühen S0-Stadium konnte vermehrt *SUVH8*-mRNA detektiert werden. Dabei verstärkt sich dieser Effekt mit fortschreitender Seneszenz. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg der Expression in der *SUVH2*-oe-Linie während der Seneszenz im Vergleich zum WT deutlich supprimiert.

Demnach ist die Expression von *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH6* sowie *SUVH9* im WT während der Seneszenz nicht verändert. Allerdings konnte für die drei Gene *SUVH2*, *SUVH4* und *SUVH5* ein Absinken und für *SUVH8* ein Anstieg der relativen Transkriptgehalte während der Seneszenz festgestellt werden. Weiterhin zeigten die Expressionsanalysen, dass die Expressionsprofile fast aller untersuchten *SUVH*-Gene nicht durch die *SUVH2*-Überexpression beeinflusst sind. Eine sehr interessante Ausnahme stellt allerdings *SUVH8* dar. Für dieses Gen konnte ein deutlich verzögerter Anstieg der mRNA-Menge in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen festgestellt werden.

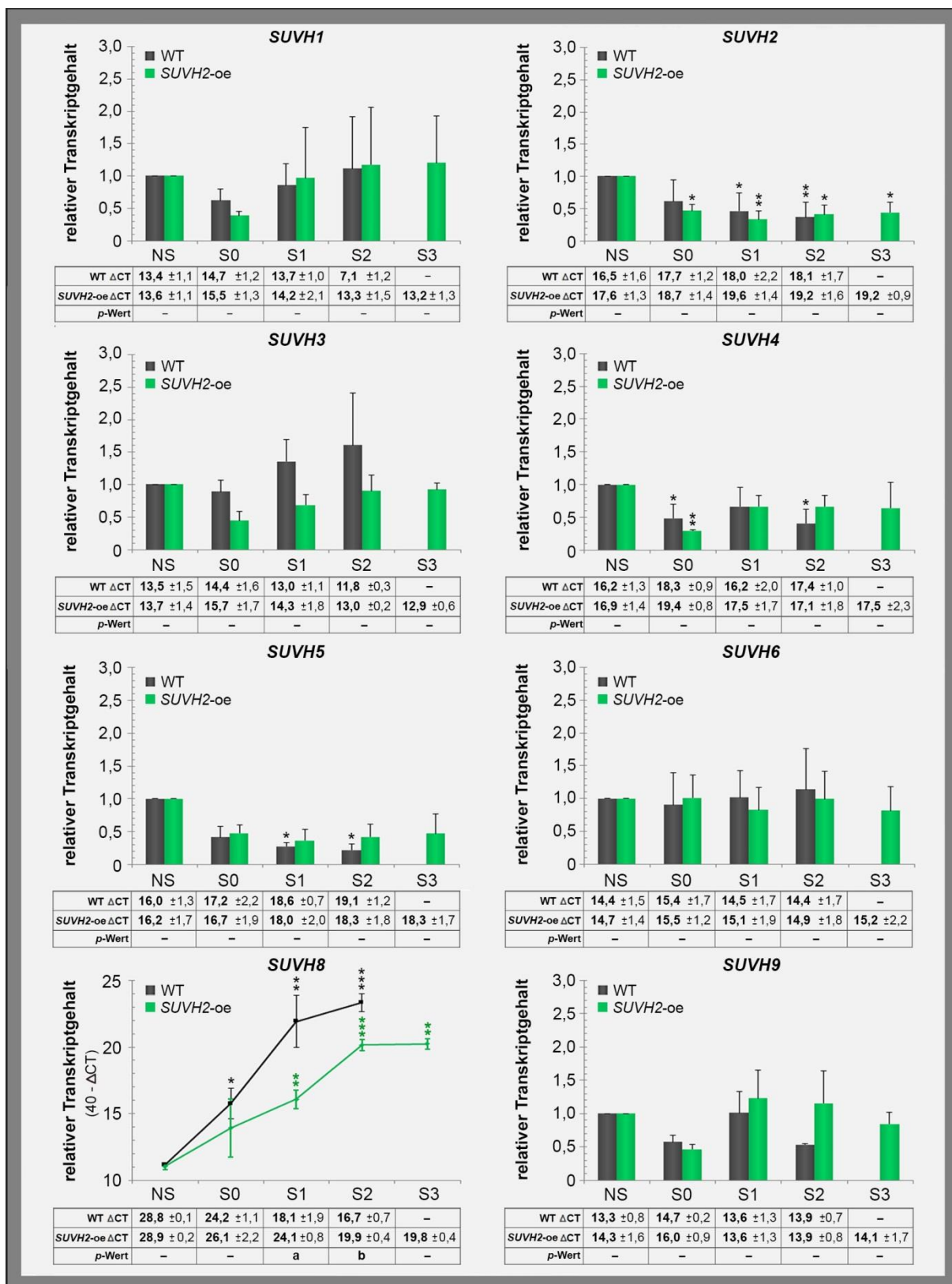


Abbildung III-32: Expression der SUVH-Gene während der Seneszenz im WT und in der SUVH2-oe-Linie. Bestimmung der relativen Transkriptgehalte mittels qRT-PCR für den WT und die SUVH2-oe-Linie in den drei (WT) bzw. vier (SUVH2-oe) definierten Seneszenzstadien S0, S1, S2 und S3, bezogen auf die Transkriptgehalte der Kontrolle (NS), die gleich eins gesetzt wurde. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf die 18S rRNA nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.2). Die Expressionsdaten für SUVH8 sind aufgrund der nicht im NS-Stadium nachweisbaren Expression nach der $40-\Delta CT$ -Variante ($40 = \text{max. Anzahl der PCR-Zyklen}$) dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede (zweiseitiger Student *t*-Test) zwischen den Seneszenzstadien und der Kontrolle (NS) sind durch Sternchen markiert $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Für jedes Gen sind zudem die Mittelwerte (MW) der ΔCT -Werte mit entsprechender Standardabweichung tabellarisch für jedes einzelne Stadium für den WT und die SUVH2-oe-Linie gezeigt. Signifikante Unterschiede der ΔCT -Werte zwischen dem WT und der SUVH2-oe-Linie für jedes einzelne Stadium sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet [$p < 0,05$ (a), $p < 0,01$ (b)].

- IV. DISKUSSION & AUSBLICK -

Seneszenzprozesse in Pflanzen sind eng mit dem gesamten Entwicklungsprogramm eines Individuums verknüpft und vom Alter selbst abhängig. Darüber hinaus können verschiedene äußere Faktoren, wie Licht, Wasserverfügbarkeit oder Pathogenbefall, Seneszenzprozesse beeinflussen. Dadurch entsteht ein vielschichtiges Zusammenspiel verschiedener Regulationswege, die es den sessilen pflanzlichen Organismen ermöglichen, Seneszenzprogramme in Abhängigkeit von sich verändernden Umweltbedingungen zu modulieren und so den Fortgang ihrer Entwicklung zu adaptieren. Dabei ist die differentielle Genregulation ein wichtiger Mechanismus, der an der Konvertierung solcher Signale und ihrer Verknüpfung mit Seneszenzprozessen beteiligt ist. Eine Vielzahl von Transkriptomstudien konnten zeigen, dass es während der Blattseneszenz zu massiven Veränderungen der Genexpression kommt (Buchanan-Wollaston et al. 2003; Buchanan-Wollaston et al. 2005; Guo et al. 2004; Breeze et al. 2011). Die Transkription von Genen kann durch verschiedene, sich z. T. beeinflussende Faktoren, wie der Wirkung von Transkriptionsfaktoren, (TFs) an *cis*-regulatorischen DNA-Elementen oder auch Veränderungen des Chromatins kontrolliert werden. Für eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen sowie Stressantworten der Pflanze konnte eine Beteiligung chromatinmodifizierender Prozesse an der Regulation von Genen nachgewiesen werden (zusammengefasst in Luo et al. 2012; Berr et al. 2012; Gan et al. 2013; Pecinka und Mittelsten Scheid 2012).

Für diese Arbeit stellte sich die übergeordnete Frage, ob es auch während der Blattseneszenz zu Veränderungen der Chromatinstruktur kommt, die Einfluss auf die Expression von Genen haben könnten. Dazu erfolgten verschiedene Analysen, um globale und lokale Verteilungsmuster spezifischer Chromatinmodifikationen im Modellorganismus *Arabidopsis* zu erfassen.

IV.1 Während der Blattseneszenz kommt es zu globalen Veränderungen der Chromatinstruktur in *Arabidopsis* Interphasezellkernen.

Eu- und heterochromatische Chromatinbereiche in Kernen ausdifferenzierter Zellen von reifen *Arabidopsis* Rosettenblättern weisen eine charakteristische Verteilung von Histonmodifikationen auf. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die Analyse bekannter euchromatischer und heterochromatischer Histonmodifikationen an reifen und seneszenten Blattgeweben über immunozytologische Untersuchungen, um mögliche Veränderungen der Verteilungsmuster dieser Chromatinmodifikationen zu dokumentieren. Da man verschiedene Stadien der Blattseneszenz, wie Initiations-, Progressions- und Endphase, unterteilt und der gesamte Prozess über einen relativ langen Zeitraum abläuft, wurden zunächst verschiedene Phasen der Blattseneszenz über physiologische Parameter definiert (s. Kapitel III.1). Die immunozytologischen Untersuchungen erfolgten daraufhin an reifen, nicht seneszenten Blättern (NS-Stadium) sowie Blättern eines mittleren (S1) und eines späten Seneszenzstadiums (S2) unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Histonmodifikationen H3K4me₂, H3K4me₃ (beide euchromatisch und mit

transkriptionskompetentem Chromatin assoziiert), H3K9me2 (heterochromatisch und mit repressivem Chromatin assoziiert) sowie H3K27me3 (euchromatisch, jedoch mit repressivem Chromatinzustand assoziiert). Zudem wurde die seneszenzabhängige Verteilung der zentromeren 180bp-*Repeats* über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FiSH) untersucht. Die immunozytologischen Analysen an seneszentem Blattgewebe ergaben deutliche Veränderungen aller untersuchten Histonmodifikationen sowie der 180bp-*Repeats* (s. Kapitel III.2). Dabei konnte festgestellt werden, dass es bereits in einem relativ frühen Stadium der Seneszenz (S1-Stadium) zu einer Umstrukturierung der Verteilungsmuster der untersuchten Histonmodifikationen kommt. Insbesondere wurde eine Umverteilung der heterochromatinassoziierten H3K9me2-Histonmodifikation sowie der 180bp-*Repeats* beobachtet und zeigt, dass sowohl perizentromerische Bereiche als auch die Zentromere deutlichen Veränderungen während der Seneszenz unterliegen. So werden die in reifen Blättern distinkten Immunofluoreszenzsignale der Chromozentren während der Seneszenz deutlich diffuser und großflächiger, was auf eine Dekondensation des konstitutiven Heterochromatins hinweist. Gleichzeitig zeigten Genexpressionsstudien bekannter SAGs eine deutliche Induktion der Genexpression in diesem Stadium (s. Kapitel III.1.2). Globale Veränderungen des Chromatins innerhalb von Seneszenzprozessen wurden bereits in einigen Untersuchungen sowohl für tierische als auch pflanzliche Systeme beobachtet (Drumm und Nagl 1982; Kolodziejek et al. 2007; Damri et al. 2009). Eine Dekondensation heterochromatischer Bereiche während der Seneszenz konnte z.B. für menschliche Fibroblasten durch De Cecco et al. (2013) gezeigt werden. In tierischen Systemen wurde bereits 1997 das sog. "*heterochromatin loss model of ageing*" von Villeponteau (1997) formuliert. Dieses Modell besagt, dass in frühen Entwicklungsphasen etablierte Heterochromatinomänen altersabhängig schrittweise degenerieren und daraus eine Derepression von stillgelegten Genen resultieren kann. Diese Hypothese wird durch eine Vielzahl von Untersuchungen in tierischen Systemen gestützt, die zeigen, dass Seneszenzprozesse von Veränderungen des Heterochromatins begleitet sind (zusammengefasst in Sedivy et al. 2008; Feser und Tyler 2011). Zudem konnte über Analysen der DNA-Methylierungsmuster in seneszierenden Säugerzellen ein allgemeiner Verlust von Heterochromatin beobachtet werden (Swanson et al. 2013; Sidler et al. 2014). Dies geschieht zumeist an repetitiven Sequenzen und betrifft demnach wahrscheinlich insbesondere konstitutives Heterochromatin. Auch in anderen tierischen Organismen, wie *Drosophila*, konnte ein deutlicher Zusammenhang der Heterochromatinbildung mit der Lebensdauer der Organismen gezeigt werden (Larson et al. 2012). Allerdings gibt es auch kontroverse Entdeckungen bezüglich der Veränderungen des Heterochromatins. So konnte im humanen System gezeigt werden, dass es während der Seneszenz zur Ausbildung neuer fakultativer Heterochromatinomänen kommt, die als SAHFs (*Senescence-Associated Heterochromatin Foci*) bezeichnet werden (Narita et al. 2003).

Innerhalb dieser Arbeit konnten über die immunozytologischen Untersuchungen deutliche Veränderungen der globalen Verteilungsmuster der untersuchten Histonmodifikationen in Zellkernen während der voranschreitenden Blattalterung nachgewiesen werden. Allerdings geben sie nur bedingt Hinweise darauf, ob diese Veränderungen auch einen Einfluss auf die absoluten Mengen der Modifikationen haben. In Studien an *Drosophila* konnte z.B. festgestellt werden, dass es während der Alterung zu einer Verringerung der absoluten Mengen von Histon H3 und vor allem von K9me2-modifiziertem H3 kommt, während die H3K4me3-Modifikation nur einen geringen Abfall aufwies (Larson et al. 2012). Untersuchungen in Gerste (*Hordeum vulgare*) zeigen zudem, dass es auch in Pflanzen zu einer generellen Abnahme von H3K9me2 während der Blattseneszenz kommt (Ay und Janack et al. Manuskript in Vorbereitung). Zukünftig sollten daher Untersuchungen der absoluten Mengen der Histonmodifikationen z.B. über *Western-Blot*-Analysen auch für *Arabidopsis* erfolgen.

Veränderungen der Chromatinstruktur, konnten auch in einigen Studien in seneszenzassoziierten Entwicklungsstadien und unter Stressbedingungen nachgewiesen werden. Beispielsweise beobachteten Tessadori et al. (2007), dass es während der Induktion des Blühens in *Arabidopsis* Pflanzen zu einer drastischen und transienten Dekondensation von sowohl perizentrischen als auch gendichten Chromatinbereichen in Mesophyll-Interphasekernen kommt. Darüber hinaus stellten Pecinka et al. (2010) fest, dass es durch Langzeit Hitzestress in über 50% der untersuchten Kerne zu einer massiven Dekondensation der Chromozentren kommt. Interessanterweise war dies nur für ausdifferenzierte, jedoch nicht für meristematische Zellen beobachtbar. Einen weiteren Hinweis dafür, dass die Chromatinstruktur wichtig für einen normalen Seneszenzverlauf ist, geben Untersuchungen an dem AT-hook Protein ORE7 (ORESARA 7). Lim et al. (2007b) konnten für Pflanzen, die ORE7 überexprimieren, neben einer veränderten Chromatinstruktur eine verlängerte Lebensdauer der Blätter feststellen.

Zusätzlich zu den detektierten Veränderungen in der Verteilung euchromatischer und vor allem heterochromatischer Chromatinmodifikationen konnte beobachtet werden, dass mit fortschreitender Seneszenz der Nukleolus entweder deutlich verkleinert oder in der Mehrzahl der analysierten Kerne nicht mehr eindeutig identifizierbar ist (s. Kapitel III.2.4). Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Reismesophyllzellen während dunkelinduzierter Seneszenz von Lee und Chen (2002) zeigen, dass die Degeneration der Nukleoli während der Seneszenz nicht nur in *Arabidopsis* stattfindet. Zusätzliche Hinweise für eine Bedeutung der Nukleoli in Bezug auf pflanzliche Seneszenzprozesse geben zudem Daten einer neueren Studie von Dona et al. (2013) an transgenen *Medicago truncatula* Pflanzen. Die Autoren konnten zeigen, dass die Repression der Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TPD1), ein Enzym, das u. a. an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist, zu einem gestörten Aufbau der Nukleoli führt und dass es in diesen Pflanzen neben einer verringerten Ribosomenbiogenese u. a. zur Induktion von SAGs sowie einer beschleunigten Seneszenz kommt. Neben den bekanntesten

Funktionen der Nukleoli innerhalb der rDNA-Transkription ribosomaler RNAs (rRNAs) sowie deren Prozessierung und Assemblierung mit ribosomalen Proteinen werden diesem Organell und somit den rDNA *Repeats* insbesondere in Hefe und tierischen Systemen eine Vielzahl weiterer wichtiger Funktionen, wie die Kontrolle des Zellzyklus, die Stressantwort sowie Seneszenz- und Alterungsprozesse, zugeordnet (Boisvert et al. 2007; Boulon et al. 2010; Kobayashi 2008; Mehta et al. 2007; Olson et al. 2000). Weitere Hinweise für eine Beteiligung der funktionellen und strukturellen Integrität der Nukleoli innerhalb pflanzlicher Seneszenzprozesse geben Studien an HDA6, eine Histondeacetylase, die für Gen *Silencing*-Prozesse in Arabidopsis wichtig ist (Liu et al. 2012; Aufsatz et al. 2007; Earley et al. 2010). Für zwei mutierte Allele (*sil1* und *axe1-5*) des *HDA6*-Gens konnte gezeigt werden, dass die Mutationen eine Dekondensation und damit eine Reaktivierung von rDNA-*Repeats* verursachen (Probst et al. 2004). Diese Daten, zusammen mit der teilweise in den Nukleoli nachgewiesenen Lokalisation von HDA6, geben deutliche Hinweise auf eine direkte Funktion dieses Proteins am rDNA *Silencing*. Für *hda6*-Mutanten wurde darüber hinaus gezeigt, dass es zu einem Verlust repressiver Chromatinmodifikationen, wie der DNA-Methylierung sowie der H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen, bei einem gleichzeitigen Anstieg aktivierender euchromatischer Modifikationen, wie H3K4me3 und vor allem den Acetylierungen an H3 (K9, K14, K18, K23 und K27) sowie an H4 (K5, K8, K12), verbunden mit einer Initiation der Transkription von Zielgenen kommt (Earley et al. 2010; To et al. 2011). Interessanterweise beobachteten Wu et al. (2008) für *axe1-5*-Mutanten sowie eine *HDA*-RNA-i-Linie eine verzögerte Blattseneszenz sowie eine späte Induktion des Blühens. Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Humbeck von Frau Ria Uhlemann durchgeführt wurden, konnten ebenfalls für eine *hda6*-EMS-Mutante eine deutlich spätere Induktion von Seneszenzprozessen in den Arabidopsis Rosettenblättern nachweisen. Interessanterweise zeigen die dabei analysierten *hda6*-EMS-Mutanten keine verzögerte Blühinduktion (Daten unveröffentlicht). Diese Daten bekräftigen die Schlussfolgerungen von Wu et al. (2008) über den möglichen Einfluss von HDA6 auf den Verlauf von Seneszenzprozessen. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass Proteinkomponenten, die an der Generierung sog. *small interfering* RNAs (siRNAs) beteiligt sind, wie die große Untereinheit der pflanzenspezifischen RNA-Polymerase IV (NRPD1b), AGO3, DCL3 (DICER-LIKE 3) und RDR2 (RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2) eine Kollokalisierung mit siRNAs im Nukleolus aufweisen (Li et al. 2006a; Pontes et al. 2006). Diese siRNAs wiederum sind an der Etablierung von DNA-Methylierung und damit repressiven Chromatinzuständen über den sog. RdDM-Weg (*RNA directed DNA methylation pathway*) beteiligt. Dadurch ist indiziert, dass der Nukleolus an der siRNA-Bildung und der Assemblierung von Silencingkomplexen involviert ist.

Wenngleich tierische Alterungsprozesse sich deutlich von pflanzlichen Seneszenzprozessen unterscheiden, lassen die zytologischen Beobachtungen der Dekondensation des Heterochromatins sowie der Desintegration des Nukleolus in seneszierenden pflanzlichen und tierischen Organismen

vermuten, dass es sich hierbei um einen konservierten Alterungsmechanismus handeln könnte, der zumindest zum Teil ähnlich kontrolliert ablaufen könnte. Alles in allem bleibt jedoch bislang ungeklärt, ob die beobachteten Veränderungen des Chromatins und insbesondere die Dekondensation großer heterochromatischer Bereiche in den seneszierenden Blattzellen nur eine Begleiterscheinung einer generellen Desintegration der Kernstruktur sind, oder ob es sich um zielgerichtete Regulationsprozesse handelt, die an der Steuerung der Blattseneszenz beteiligt sind.

IV.2 Die Überexpression von SUVH2 führt zu einem verzögerten Verlauf der Blattseneszenz und supprimiert globale seneszenzabhängige Chromatinveränderungen.

Ein möglicher Weg aufzuklären, ob die beobachtete Dekondensation heterochromatischer Bereiche und das Schwinden der Nukleoli einen Einfluss auf den Verlauf der Blattseneszenz haben könnte, ist die Generierung von *gain-of-function* und *loss-of-function* Transgenen von Faktoren, die an der Ausbildung heterochromatischer Strukturen beteiligt sind. Innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Humbeck (MLU Halle-Wittenberg) erfolgte dazu ein erstes Seneszenzscreening an einem Set transgener Linien von 15 solcher putativer Faktoren (s. Kapitel III.4, Tab. III-1). Diese ersten phänotypischen Analysen ergaben, dass die histonmodifizierenden Proteine HDA6, SUVH1 und SUVH2 einen veränderten Verlauf der Blattseneszenz aufweisen. Sowohl für *HDA6*- also auch *SUVH2*-Transgene ist bekannt, dass die entsprechend veränderten Proteingehalte die Chromatinstruktur beeinflussen (Naumann et al. 2005; Probst et al. 2004). Der stärkste Effekt auf den Verlauf der Blattseneszenz konnte für eine Überexpressionslinie der putativen Histonmethyltransferase SUVH2 (*SUVH2-oe*) festgestellt werden. Für das heterochromatinassoziierte SUVH2-Protein konnte eine wichtige Funktion innerhalb der Heterochromatinausbildung und heterochromatischen Gensilencingmechanismen in *Arabidopsis* gezeigt werden (Naumann et al. 2005). Die *SUVH2-oe*-Linie sowie eine korrespondierende *SUVH2 loss-of-function* Linie (*suvh2-GK*) wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich des Seneszenzverlaufs anhand physiologischer Messungen in einer detaillierten Seneszenzkinetik vergleichend zum Wildtyp analysiert. Die physiologische Charakterisierung ergab, dass es in Pflanzen, die SUVH2 überexprimieren, tatsächlich zu einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz kommt (s. Kapitel III.4.2.2.2). Im Gegensatz dazu konnte kein deutlicher Phänotyp für die *suvh2-GK*-Linie festgestellt werden (s. Kapitel III.4.2.2.1). Kathrin Naumann (2006) lieferte in ihrer Dissertation Hinweise dafür, dass die Histonmethyltransferase SUVH4 möglicherweise die Effekte des fehlenden SUVH2-Proteins in *suvh2*-Mutanten kompensieren könnte. Sie konnte nachweisen, dass es in Folge einer Infektion mit dem RNA-Potyvirus *TuMV* (*Turnip Mosaic Virus*) zu einem Anstieg der SUVH2-Expression in *Arabidopsis* WT-Pflanzen kommt. Interessanterweise zeigte sie weiter, dass es in infizierten *suvh2*-Nullmutanten zu einem Anstieg des SUVH4-Transkriptgehaltes kommt, der dagegen in WT-Pflanzen unverändert nach Virusbefall blieb. Dies könnte erklären, warum die in dieser Arbeit verwendete *suvh2-GK*

knockdown-Linie keine Effekte in Bezug auf die Seneszenz hatte. Zukünftig könnte daher das Expressionsverhalten aller *SUVH*-Gene in der *svh2*-GK im Vergleich zum WT während der Seneszenz untersucht werden, um mögliche Redundanzen der SUVH-Proteine zu untersuchen.

Für die *SUVH2*-oe-Linie erfolgten zudem Expressionsstudien der zehn bereits im WT analysierten Seneszenzmarkergene, um einen ersten Überblick über die molekularen Effekte auf den Verlauf der Blattseneszenz zu erhalten (s. Kapitel III.4.3). Dabei zeigte sich, dass alle acht der untersuchten SAGs sowie eines der beiden SDGs ein signifikant unterschiedliches Expressionsprofil innerhalb der Seneszenzkinetik im Vergleich zum WT aufwies. Für alle SAGs konnte dabei eine Suppression der seneszenzabhängigen Induktion festgestellt werden. Darüber hinaus wurde für drei der acht SAGs ein bereits in reifen Blättern erhöhter Transkriptgehalt im Vergleich zum WT bestimmt. Auf Grund des starken Seneszenzphänotyps der *SUVH2*-oe-Linie erfolgten analog zum WT immunozytologische Untersuchungen. Naumann et al. (2005) konnten für nicht seneszente Arabidopsis Rosettenblätter zeigen, dass die Überexpression von SUVH2 in einer ektopischen Verteilung der heterochromatinassoziierten Histonmethylierungen H3K9me1+2, H3K27me1+2 sowie H4K20me1 resultiert (Naumann et al. 2005). Die immunozytologischen Analysen innerhalb dieser Arbeit in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen für die H3K9me2-Modifikation bestätigen diese ektopische Umverteilung in Interphasekernen reifer Blätter (s. Kapitel III.4.4.1). Weiterhin ergaben die Untersuchungen in den Seneszenzstadien, dass die für den WT beobachtete seneszenzabhängige Dekondensation der H3K9me2-Immunofluoreszenzsignale vollständig in *SUVH2*-oe-Pflanzen supprimiert ist. Darüber hinaus zeigten die FiSH-Analysen der zentromeren 180bp-*Repeats*, dass die distinkte Konzentration dieser *Repeats* bis in das späte Seneszenzstadium S3, das dem S2-Stadium des WTs entspricht und bei dem auch in den Blättern der *SUVH2*-oe-Linie der Chlorophyllabbau weit fortgeschritten ist, erhalten bleibt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es in den *SUVH2*-oe-Pflanzen während der Seneszenz nicht zu dem im WT beobachteten Verlust der Nukleoli kommt. Auch die stärkere Strukturierung der Immunofluoreszenzsignale der drei euchromatischen Histonmethylierungen H3K4me2+3 und H3K27me3, die während der Seneszenz im WT dokumentiert wurde, konnte für die *SUVH2*-oe-Linie nicht beobachtet werden.

Alles in allem zeigen die immunozytologischen Chromatinanalysen in der *SUVH2*-oe-Linie auffallend, dass die stetige Überexpression der putativen Histonmethyltransferase die Dekondensation des konstitutiven Heterochromatins sowie die Degenerierung der Nukleoli vollständig supprimiert. Diese Beobachtungen korrelieren dabei mit einer deutlichen Verzögerung des Seneszenzverlaufs sowie dem veränderten Expressionsverhalten von Seneszenzmarkergenen in der *SUVH2*-oe-Linie. Um zukünftig genauer aufzuschlüsseln, welche molekularen Mechanismen den veränderten Seneszenzverlauf in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen verursachen, wäre es interessant, seneszenzinduzierbare *gain-of-function* und *loss-of-function SUVH2*-Pflanzen zu generieren. Dies würde eine gezielte Analyse des Chromatins von Pflanzen ermöglichen, die sich

bis zum Einsetzen der Seneszenz mit einer dem WT entsprechenden SUVH2-Proteinmenge entwickelt haben. Dadurch könnte der Einfluss pleiotroper Effekte, die die konstitutive Überexpression von SUVH2 verursacht, minimiert werden. Weiterhin wäre es wichtig zu überprüfen, ob in der verwendeten *SUVH2 loss-of-function*-Linie (*suvh2-GK*) tatsächlich redundante Histonmethyltransferasen, wie SUVH4, mögliche seneszenzspezifische Funktionen von SUVH2 übernehmen oder nicht. Dies könnte den Informationsgehalt darüber erhöhen, ob die verminderte Expression von *SUVH2* während der Seneszenz im WT (s. Kapitel III.4.2.2.2; Abb. III-11) tatsächlich einen Einfluss auf die seneszenzspezifischen Veränderungen des Heterochromatins hat, oder ob zusätzlich oder sogar ausschließlich andere Faktoren dabei involviert sind. Daher wäre es interessant, den Einfluss weiterer Komponenten, für die eine Funktion an der Ausbildung heterochromatischer Strukturen und/oder an der Etablierung und Aufrechterhaltung aktiver und stillgelegter rDNA *Repeats* bekannt ist, wie z.B. HDA6, SUVH5 oder VIM1 (VARIANT IN METHYLATION 1), auf die globale Chromatinstruktur während der Seneszenz zu untersuchen.

IV.3 Lokale Histonmodifikationsmuster an SAG-Markergenen während der Blattseneszenz in Arabidopsis.

Entwicklungsabhängig oder in Antwort auf äußere Stimuli können verschiedene Zustandsformen des Chromatins durch die kombinatorische Wirkung einer Vielzahl von Modifikationen etabliert werden. Diese Chromatinzustände korrelieren dabei mit einer unterschiedlichen Transkriptionskompetenz von Genen (Roudier et al. 2011; Li et al. 2008). Für die Etablierung der verschiedenen Zustände ist eine Vielzahl von Mechanismen verantwortlich, wobei posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen sowie die Methylierung der DNA zu den am besten untersuchten zählen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur globalen Chromatinstruktur während der Seneszenz innerhalb dieser Arbeit legten nahe, dass es auch lokal an seneszenzabhängig regulierten Genen zu Veränderungen des Chromatins kommen könnte. Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Genexpression und Modifikationen von Histonen aufzuklären, wurden repräsentativ drei SAG-Markergene (*SAG12*, *ANAC083* und *WRKY53*) ausgewählt und Chromatinimmunopräzipitationen (ChIPs) unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die vier Histonmodifikationen H3K4me₂, H3K4me₃, H3K9me₂ und H3K27me₃ an diesen Loci durchgeführt. Für jedes Gen erfolgten die ChIP-Analysen für jeweils zwei Regionen mittels spezifischer Primer. Die Untersuchungen ergaben unterschiedliche Muster der Histonmodifikationen in den zwei verglichenen Entwicklungsstadien NS (basale Expression der SAGs) und S1 (deutlicher Anstieg der Expression) an den untersuchten Genen (s. Kapitel III.3.2). Für eine Promotorregion von *ANAC083* (*ANAC083-I*) und beide untersuchten *WRKY53*-Genregionen ergaben die ChIP-Untersuchungen, dass es im S1-Stadium zu einer signifikanten Anreicherung der euchromatischen H3K4me₂-Modifikation kommt. Weiterhin wurden keine

deutlichen Veränderungen aller anderen untersuchten Histonmodifikationen zwischen dem NS- und dem S1-Stadium für die untersuchten Bereiche von *ANAC083* detektiert. Allerdings konnten die ChIP-Analysen zeigen, dass der untersuchte kodierende Bereich von *ANAC083* (*ANAC083-II*) in beiden Stadien mit hohen Mengen der aktivierenden H3K4me₂- und der H3K4me₃-Histonmodifikationen assoziiert vorliegt. Zusammenfassend konnten für *ANAC083* kaum Veränderungen der untersuchten Modifikationen während der Seneszenz festgestellt werden, obwohl sich die Expression dieses TFs im S1-Stadium deutlich verstärkt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die seneszenzabhängige Regulation der Genexpression von *ANAC083* ausschließlich über chromatinunabhängige Mechanismen moduliert wird. Gleichzeitig kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Histonmodifikationen, für die ein Einfluss auf die Expression von Genen gezeigt wurde, wie H3K9ac oder H3K36me₃, an der seneszenzabhängigen Induktion von *ANAC083* beteiligt sind.

Für *SAG12* und *WRKY53* ergaben die Untersuchungen, dass in reifen Blättern (NS-Stadium) in Bezug auf das verwendete Referenzgen *TUA4* nur geringe Mengen der H3K4me₃-Modifikation an den untersuchten Genbereichen etabliert sind. Allerdings wurde ein signifikant erhöhtes Vorkommen dieser Modifikation an beiden Genen im S1-Stadium detektiert. Insbesondere an *WRKY53* kommt es zu einer deutlichen Etablierung von H3K4me₃. Die zusätzliche Markierung mit dieser aktivierenden Modifikation an *SAG12*- und *WRKY53*-assoziierten Histonen korreliert dabei mit einer starken Induktion der Genexpression im S1-Stadium beider Gene. Ein hohes Vorkommen von K4me₃-modifiziertem H3 ist i. d. R. mit einer Chromatinstruktur verbunden, die eine maximale Transkription erlaubt (Zhang et al. 2009; Li et al. 2008). ChIP-seq-Analysen der genomweiten Verteilung der H3K4me₃- und der H3K27me₃-Modifikation, die an reifem und seneszenten Blattmaterial von Brusslan et al. (2012) durchgeführt wurden, konnten ein hohes Vorkommen von H3K4me₃ in beiden untersuchten Stadien am *WRKY53*-Gen nachweisen. Allerdings wurde kein Anstieg von H3K4me₃ in seneszenten Blättern beobachtet. Daraufhin untersuchten die Autoren das korrespondierende Expressionsverhalten von *WRKY53*. Dabei stellte sich heraus, dass es nur zu einer 1,7fachen Induktion der Expression im Vergleich zur Kontrolle kam. Demnach ist es wahrscheinlich, dass *WRKY53* bereits im verwendeten Kontrollstadium einen hohen Transkriptgehalt aufwies und die beiden in diesen Untersuchungen verwendeten Stadien demnach nicht für die Analyse der Histonmodifikationen für *WRKY53* optimal waren. Eine weitere Möglichkeit für die Diskrepanzen der ChIP-Daten, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden und den genomweiten Studien, könnten die sehr unterschiedlichen Anzuchtbedingungen sowie das untersuchte Blattmaterial sein. Innerhalb dieser Arbeit erfolgten die ChIP-Analysen an physiologisch definiertem Material von Blättern, die einen vergleichbaren Entwicklungsstand hatten und in denen deutliche Unterschiede der *WRKY53*-Expression feststellbar waren. Dabei wuchsen die Pflanzen einzeln in Töpfen auf Erde unter Langtagbedingungen (Tag-Nacht-Rhythmus) auf. Im Gegensatz dazu kamen für die genomweiten Analysen von Brusslan et al.

(2012) die gesamten Rosettenblätter von 23 Tage alten Pflanzen, bei denen es bereits zu einer Induktion des Blühens gekommen ist, bzw. 52 Tagen alten Pflanzen, die unter Dauerlichtbedingungen angezogen wurden, zum Einsatz.

Für *WRKY53* wurde eine Beteiligung innerhalb der Regulation der Seneszenz sowie der Immunantwort in *Arabidopsis* nachgewiesen (Robatzek und Somssich 2001; Miao et al. 2004; Hu et al. 2012). Interessanterweise konnten Jaskiewicz et al. (2011) zeigen, dass es zu einem Anstieg der euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me2 und insbesondere H3K4me3 an *WRKY53* in Antwort auf Pathogenbefall kommt. Zusammen mit den Ergebnissen der ChIP-Analysen innerhalb dieser Arbeit lässt sich demnach postulieren, dass die Aktivierung der Expression des Gens während der Seneszenz und auch innerhalb der Phytopathogenantwort von Veränderungen dieser Histonmodifikationsmuster begleitet wird. Auch für weitere seneszenzassoziierte *WRKY*-TFs, wie *WRKY6* und *WRKY70* für die zudem eine Funktion innerhalb der Kontrolle der pflanzlichen Phytopathogenantwort bekannt ist (Li et al. 2006b; Besseau et al. 2012; Robatzek und Somssich 2002), wurde ein Anstieg der aktivierenden H3K4me3-Modifikation nach Pathogenbefall nachgewiesen (Jaskiewicz et al. 2011; Alvarez-Venegas et al. 2007). Für *WRKY70* konnten Alvarez-Venegas et al. (2007) dabei zudem zeigen, dass die Histonmethyltransferase ATX1 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1) für die Etablierung von H3K4me3 am entsprechenden *WRKY70* Gen verantwortlich ist. Innerhalb der Analysen von Jaskiewicz et al. (2011) erfolgten keine Untersuchungen der repressiven H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen. Über die ChIP-Analysen innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl an *WRKY53* als auch *ANAC083* in beiden Entwicklungsstadien nur sehr geringe Mengen der repressiven Modifikationen assoziiert vorliegen und dass es diesbezüglich zu keinen Veränderungen zwischen den beiden untersuchten Stadien kommt. Demnach scheinen die H3K9me2- und H3K27me3-Modifikationen nicht an der Regulation der Expression dieser beiden Gene in *Arabidopsis* WT-Pflanzen während der Seneszenz involviert zu sein.

Die ChIP-Analysen von H3K27me3 zeigten dagegen ein hohes Vorkommen dieser Modifikation an *SAG12*. Für dieses Gen konnte in ChIP-Analysen an *Arabidopsis* Keimlingen ebenfalls nachgewiesen werden, dass die assoziierten H3-Proteine durch eine Trimethylierung an K27 modifiziert vorliegen (Roudier et al. 2011; Zhang et al. 2007). Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die an *SAG12* assoziierten Histone auch in reifen ausdifferenzierten Blattgeweben mit dieser Modifikation versehen sind. Genomweite Studien zeigen, dass H3K27me3 zumeist im Euchromatin an Protein-kodierenden Genen vorkommt, die reprimiert sind oder gewebeabhängig exprimiert werden (Zhang et al. 2007; Roudier et al. 2011; Lafos et al. 2011). Die verschiedenen Autoren identifizierten innerhalb dieser globalen Untersuchungen zwischen etwa 4400 und mehr als 7000 Zielgene. Diese doch recht großen Unterschiede basieren wahrscheinlich auf den verschiedenen Analysemethoden und dem Pflanzenmaterial, das verwendet wurde. In allen Studien konnte weiterhin festgestellt werden,

dass die H3K27me₃-Modifikation besonders häufig an Genen von TFs vorliegt. Dabei sind einige TF-Familien bevorzugt Ziele dieser Modifikation, zu denen auch seneszenzassoziierte TF-Klassen wie die WRKY- oder NAC-Familie, zählen (Lafos et al. 2011). Die H3K27me₃-Modifikation wird durch Polycomb group Proteine (PcGs) etabliert (Pien und Grossniklaus 2007) und kann durch die REF6 (RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6)-Demethylase wieder entfernt werden (Lu et al. 2011). Interessanterweise kommt es im WT an *SAG12* im S1-Stadium zu einem deutlichen Verlust dieser repressiven Histonmodifikation bei gleichzeitiger Induktion der Genexpression (s. Kapitel III.3.2). In genomweiten Untersuchungen der H3K27me₃-Modifikation während der Seneszenz durch Brusslan et al. (2012) konnte ebenfalls ein starkes Vorkommen von H3K27me₃ an *SAG12* in reifen Blättern detektiert werden. Allerdings kam es in ihren Versuchen nur zu einer leichten, nicht signifikanten Verringerung dieser Modifikation in dem analysierten Seneszenzstadium (s. Appendix A.5; Abb. A-7). Hierbei kann wiederum nicht ausgeschlossen werden, dass sich das verwendete Pflanzenmaterial der genomweiten Untersuchungen und der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu sehr voneinander unterscheidet. So untersuchten Brusslan et al. (2012) zwar 52 Tage alte Pflanzen und konnten zudem eine deutliche Induktion von *SAG12* nachweisen, allerdings wurden neben den bereits erwähnten Unterschieden in der Anzucht der Pflanzen nur die grünen und nicht bereits gelb werdenden Blätter geerntet und analysiert. Neben dieser Diskrepanz für *SAG12* kommt erschwerend für die Diskussion der H3K27me₃-ChIP-Ergebnisse in dieser Arbeit hinzu, dass auch an anderen bekannten H3K27me₃-assoziierten Genen, wie *STM* und *AG* ein mehr oder weniger starker Abfall dieser Modifikation für die meisten untersuchten Genbereiche festgestellt wurde (s. Appendix A.1; Abb. A-3). Der Verlust von H3K27me₃ an mehreren Genen, der im Fall von *STM* und *AG* unabhängig von einer Änderung der Expression im S1-Stadium stattfand (Daten nicht gezeigt), ist auffällig. Im Grunde ist ein messtechnischer Fehler durch die hohe Anzahl an biologischen Replikaten ($n \geq 6$ für *SAG12*) auszuschließen. Es konnte kein Abbau der gDNA oder des Chromatins festgestellt werden. Auch die Spezifität des Antikörpers gegen die H3K27me₃-Modifikation konnte durch die bekannten Zielgene *SAG12*, *STM* und *AG* gezeigt werden. Weiterhin wurden die IPs stets zusammen mit den anderen Antikörpern durchgeführt. Bei diesen konnte kein genereller Verlust einer Modifikation nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgten einige der ChIP-Analysen parallel an Pflanzenmaterial des WTs und der *SUVH2*-oe-Linie, für die kein allgemeiner Abfall der H3K27me₃-Modifikation an *SAG12* (s. Kapitel III.4.4.2.1.1; Abb. III-15) oder den anderen H3K27me₃-markierten Genen *AG* und *STM* festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). So bleibt bislang nicht vollständig geklärt, ob die an *SAG12* beobachtete Veränderung für H3K27me₃ auf biologisch relevanten Prozessen basiert. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen bezüglich der biologischen Bedeutung der Trimethylierung von H3K27 an SAGs die *AG-I*-Region sowie weitere putative Referenzgene mit untersucht werden. Zudem könnten andere H3K27me₃-spezifische Antikörper getestet werden. Weiterhin könnte in genomweiten Untersuchungen der etablierten Seneszenzkinetik für die H3K27me₃-Modifikation

überprüft werden, ob es sich möglicherweise um einen generellen Verlust dieser Modifikation während der Seneszenz handeln könnte.

Ein weiteres interessantes Ergebnis in dieser Arbeit war das bivalente, also gleichzeitige Vorkommen, der aktivierenden H3K4me₃- und der repressiven H3K27me₃-Modifikation an *SAG12*. Eine Kolo-kalisation beider Modifikationen an Nukleosomen konnte zuerst für entwicklungsabhängig regulierte Gene in Säugern nachgewiesen werden (Bernstein et al. 2006; Mikkelsen et al. 2007; Cui et al. 2009). Für Pflanzen wurde ein bivalentes Vorkommen dieser beiden Modifikationen an einem Gen bislang ausgeschlossen (Zhang et al. 2007; Schmitges et al. 2011). Neuere Studien lieferten jedoch erste Hinweise, dass auch in pflanzlichen Systemen beide Modifikationen an einem Gen etabliert sein könnten (He et al. 2010; Lafos et al. 2011). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von Sequeira-Mendes et al. (2014) definierten für die H3K27me₃-Modifikation neben dem klassischen bislang beobachteten Chromatinzustand, bei dem ausschließlich H3K27me₃ vorkommt (Zhang et al. 2007; Roudier et al. 2011), zwei weitere H3K27me₃-assoziierte Zustände, für die z. T. eine Koexistenz mit aktivierenden Modifikationen charakteristisch ist. In diesem kombinatorischen bioinformatischen Vergleich genomweiter Datensätze von insgesamt 16 Chromatinmerkmalen (H3K9me₂, H3K27me₁, H4K5ac, H3K4me₁, H2Bub, H3K36me₃, H3K4me₂, H3K4me₃, H3K27me₃, H3K9ac, H3K14ac drei Histonvarianten (H2A.Z, H3.1 und H3.3), H3 genomischer G+C-Gehalt sowie die CpG-Methylierung) sowie Genexpressionsdaten definierten sie insgesamt neun verschiedene Chromatinzustände, die mit einer unterschiedlichen Transkriptionskompetenz assoziiert sind. Da bislang alle Untersuchungen in Pflanzen nicht wie in Säugern an einzelnen Zelllinien durchgeführt wurden, gibt es zwei denkbare Ursachen für das bivalente Auftreten der Histonmodifizierungen an einem Gen. Einerseits ist es möglich, dass beide Modifikationen gleichzeitig an ein und demselben oder an direkt benachbarten Nukleosomen koexistieren. Andererseits ist jedoch auch vorstellbar, dass solche Gene in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand einer Zelle oder vom untersuchten Gewebe jeweils mit nur einer der Modifikationen assoziiert vorliegen. Die Detektion beider Histonmethylierungen könnte demnach darauf basieren, dass gleichzeitig unterschiedliche Gewebe und/oder Zellen verschiedener Entwicklungsstadien untersucht werden. In einem elegantem Re-ChIP-Ansatz (sequentielle ChIP), bei dem ChIP-Analysen nacheinander mit den beiden Antikörpern gegen die H3K4me₃- und die H3K27me₃-Modifikation erfolgten, untersuchten Sequeira-Mendes et al. (2014) putativ bivalent markierte Gene um zu überprüfen, ob diese Gene tatsächlich gleichzeitig mit beiden Modifikationen an ein und demselben Nukleosom bzw. zumindest an benachbarten Nukleosomen markiert sind. Durch diesen Ansatz konnten sie für den Großteil der untersuchten Gene ein bivalentes Vorkommen der beiden Modifikationen nachweisen. Für die restlichen Gene ist es wahrscheinlich, dass sie jeweils monovalent mit H3K4me₃ bzw. H3K27me₃ in Abhängigkeit vom Gewebe und Entwicklungszustand vorliegen. Zukünftig stellen sequentielle ChIP-Analysen demnach einen möglichen Weg dar, um zu überprüfen, ob es sich bei

der festgestellten bivalenten Modifikation von *SAG12* tatsächlich um koexistierende oder um gewebs- bzw. altersabhängige Modifikationen handelt.

Für alle drei untersuchten SAGs konnten im Verhältnis zur verwendeten perizentromerischen Referenz-DNA-Region (*180bp single repeat; 180bp SR*) nur geringe Mengen der H3K9me2-Modifikation nachgewiesen werden. Das schwache Vorkommen von H3K9me2 an den untersuchten Genen war zu erwarten, da es sich um eine Histonmodifikation handelt, die vor allem mit Transposons, repetitiver DNA und konstitutiv stillgelegten DNA-Bereichen assoziiert vorliegt. Dennoch sind weit über 3000 Gene in genomweiten Untersuchungen in *Arabidopsis* identifiziert worden, von denen allerdings wiederum über 90% in zentromeren und perizentromeren Heterochromatinbereichen lokalisiert sind (Rehrauer et al. 2010). H3K9me2 gilt als eine starke repressive Histonmodifikation und korreliert i. d. R. mit einer deutlichen Suppression der Expression von H3K9me2-markierten Genen (Bernatavichute et al. 2008; Rehrauer et al. 2010). Die vergleichsweise stärkste Markierung der drei untersuchten SAGs mit dieser Modifikation konnte für *SAG12* an der *SAG12-II*-Region, in Übereinstimmung mit genomweiten Daten für *SAG12* in Keimlingen, detektiert werden. Interessanterweise kommt es an *SAG12* als einzigem der drei untersuchten Gene im S1-Stadium zu einem signifikanten Verlust dieser Modifikation. Im NS-Stadium wurde an *SAG12* zudem auch eine deutliche Assoziation mit H3K27me3-modifiziertem Chromatin gezeigt. Sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tieren konnte in genomweiten Studien gezeigt werden, dass sich H3K9me2- und H3K27me3-modifiziertes Chromatin i. d. R. gegenseitig ausschließen (Turck et al. 2007; Roudier et al. 2011). Erneut könnten hier sequentielle ChIP-Analysen zukünftig aufklären, ob es sich tatsächlich um ein bivalentes Vorkommen der H3K9me2- und der H3K27me3-Modifikation an dem untersuchten Bereich des *SAG12*-Gens handelt. Genomweite Analysen an *Arabidopsis* Keimlingen ergaben, dass an dem kurzen Bereich, an dem H3K9me2 detektiert werden konnte, gleichzeitig erniedrigte H3K27me3-Werte erhalten wurden (s. Kapitel III.3.2.1; Abb. III-4B). Demnach könnte das bivalente Vorkommen dieser beiden Modifikationen in den in dieser Arbeit erfolgten ChIP-Analysen auf einer geringeren Auflösung beruhen, da in den ChIP-Analysen DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 200-500 bp analysiert wurden und demnach nicht ausgeschlossen werden kann, dass die H3K9me2- und H3K27me3-Werte auf benachbarten, jedoch letztlich gemeinsam detektierten Nukleosomen basieren.

Zusammenfassend zeigen die ChIP-Daten an *Arabidopsis* WT-Pflanzen, dass es an zwei der drei untersuchten SAG-Markergene (*SAG12* und *WRKY53*) seneszenzabhängig zu deutlichen lokalen Änderungen von Histonmodifikationen kommt, die mit einer gesteigerten Expression dieser Gene korrelieren. Die Daten indizieren, dass es auch an anderen seneszenzabhängig regulierten Genen zu Veränderungen der Chromatinstruktur kommen könnte. Des Weiteren zeigen die Veränderungen an *SAG12* sowie die genomweiten Daten von Brusslan et al. (2012), dass auch die Expression von SAGs, die nicht für TFs kodieren, über Chromatinmodifikationen reguliert sein kann.

IV.4 Die Überexpression von SUVH2 resultiert in Änderungen der seneszenzspezifischen Histonmodifikationsmuster an SAG-Markergenen.

Naumann et al. (2005) zeigten, dass die Überexpression der putativen Histonmethyltransferase SUVH2 zu einer ektopischen Umverteilung repressiver Histonmethylierungen an H3K9- und H3K27 führt. Für diese Pflanzen konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit über physiologische Messungen sowie die Bestimmung der Expressionsmuster von Seneszenzmarkergenen eine deutliche Verzögerung der Blattseneszenz nachgewiesen werden (s. Kapitel III. 4.2.2.2 und III.4.3). Zudem ergaben globale immunozytologische Analysen, dass die im WT beobachteten seneszenzabhängigen Chromatinveränderungen vollständig in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen unterdrückt werden (s. Kapitel III.4.4.1). Um zu überprüfen, ob die Überexpression von SUVH2 auch die seneszenzspezifischen Histonmodifikationen an SAGs beeinflusst, erfolgten ChIP-Analysen für die beiden Stadien NS und S1 in den *SUVH2*-oe-Pflanzen an *SAG12*, *ANAC083* und *WRKY53* (s. Kapitel III.4.4.2.1). Die gravierendsten Veränderungen der Expression zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie ergaben sich für *WRKY53* und *SAG12* (s. Kapitel III. 4.3.1). Übereinstimmend dazu konnten für diese beiden Gene auch die stärksten Veränderungen der Histonmodifikationsmuster festgestellt werden. In Korrelation mit einer leichten jedoch signifikanten Suppression der *ANAC083*-Expression im S1-Stadium der *SUVH2*-Überexpressionspflanzen wurden entsprechend nur geringe Veränderungen der Histonmodifikationsmuster detektiert.

Auf Basis der Ergebnisse der ChIP- und Expressionsanalysen in WT- und in *SUVH2*-oe-Pflanzen ergeben sich drei unterschiedliche Szenarien für die möglichen Effekte der *SUVH2*-Überexpression auf die Regulation dieser drei Gene in Abhängigkeit vom Chromatinstatus. Für eine bessere Veranschaulichung wurden diese postulierten Wege in ein Modell übertragen und sind in Abbildung IV-1 (A) für *WRKY53*, (B) für *SAG12* und (C) für *ANAC083* dargestellt.

Für *WRKY53* konnte im S1-Stadium im Gegensatz zum WT kein Anstieg der aktivierenden H3K4me2- und H3K4me3-Modifikationen in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen festgestellt werden. Gleichzeitig wurden in der *SUVH2*-oe-Linie die repressiven Modifikationen H3K9me2 und H3K27me3 an *WRKY53* assoziierten Histonen etabliert (s. Kapitel III.4.4.2.1.3; Abb.III.20 sowie schematisch in Abb. IV-1A). Eine Zunahme dieser repressiven Modifikationen konnte im WT nicht nachgewiesen werden. Die Veränderungen der Histonmodifikationsmuster in der *SUVH2*-oe-Linie korrelieren mit einer starken Repression der Transkription dieses Gens im S1-Stadium (Abb. IV-1A). Die mit aktivem Chromatin assoziierten H3K4-Methylierungen werden durch Methyltransferasen, wie z.B. die ATX1 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX), kontrolliert (Alvarez-Venegas und Avramova 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten demnach darauf hinweisen, dass in der *SUVH2*-oe-Linie zumindest lokal die Wirkungen der H3K4me3-etablierenden Enzyme durch die starke Überexpression von SUVH2 beeinflusst sind. Interessanterweise ergaben ChIP-Analysen unter Verwendung des H3C-Antikörpers, dass es im

S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie zu einem Anstieg der Nukleosomendichte an der *WRKY53-I*-Region rund um den TLS, kommt (s. Appendix A.4; Abb. A-6). Auf Grund dessen sowie des Anstiegs der H3K9me2-Modifikation und der starken Repression dieses Gens erfolgten Analysen des DNA-Methylierungsmusters an den kodierenden Bereichen von *WRKY53* (s. Kapitel III.4.4.2.2). Für die Methylierung von Cytosinen in kodierenden Bereichen konnte eine Korrelation mit einer aktiven Transkription von Genen gezeigt werden, während die Methylierung in Promotorregionen i. d. R. mit einer Repression der Transkription zusammenhängt (Cokus et al. 2008; Zhang et al. 2006; Zilberman et al. 2007). In Übereinstimmung mit den von Zentgraf et al. (2010) veröffentlichten Daten des *WRKY53*-Methylierungsmusters konnte keinerlei Methylierung in den untersuchten Genbereichen von *WRKY53* im WT in reifen und seneszenten Blättern detektiert werden. Darüber hinaus wurde auch in der *SUVH2*-oe-Linie in beiden untersuchten Stadien keine Etablierung der DNA-Methylierung an *WRKY53* festgestellt. Demnach führt die Überexpression von *SUVH2* zwar zu einem Anstieg repressiver Histonmodifikationen an *WRKY53*, allerdings unabhängig von einer Methylierung der entsprechenden Genregionen. Zukünftig könnten DNA-Methylierungsexperimente an der Promotorregion von *WRKY53* erfolgen, um zu überprüfen, ob es dort möglicherweise zu Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters in *SUVH2*-oe-Pflanzen kommt. Alles in allem bleibt in der *SUVH2*-oe-Linie der Anstieg aktivierender Modifikationen während der Seneszenz an *WRKY53* aus, während repressive Modifikationen etabliert werden. Es ist unklar wie die Überexpression von *SUVH2* diese Veränderungen verursacht. Zudem ist momentan ungeklärt, ob die Suppression der Induktion der *WRKY53*-Expression in der *SUVH2*-oe-Linie alleinig auf den Veränderungen der Histonmodifikationen basiert, oder ob zusätzlich *upstream* Regulatoren von *WRKY53* ebenfalls durch die *SUVH2*-Überexpression beeinträchtigt sind.

Wie in Abbildung IV-IB dargestellt, konnte im WT für *SAG12* in reifen Blättern ein deutliches Vorkommen der repressiven Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 rund um den TKS detektiert werden. Diese repressiven Modifikationen könnten zur Ausbildung von fakultativem Heterochromatin an *SAG12* führen, was zu einer Unterdrückung der Expression dieses Gens in reifen Blättern des WT führt. Dieser reprimierte Chromatinstatus wird beim Einsetzen der Seneszenz in einen aktiven Zustand umgewandelt, in dem die repressiven durch aktivierende Histonmodifikationen wie H3K4me3 ersetzt werden (s. Kapitel III.3.2.1 sowie Abb. IV-1B). Die Reorganisation der Histonmodifikationsmuster ermöglicht dann die starke Induktion der Transkription von *SAG12* im S1-Stadium. Im Vergleich zum WT wurden in der *SUVH2*-oe-Linie Veränderungen der Histonmodifikationsmuster detektiert. Dabei waren sowohl das NS- als auch das S1-Stadium betroffen (s. Kapitel III.4.2.2.1.1). Zum einen konnte im Unterschied zum WT für H3K4me3 festgestellt werden, dass es zu einem deutlich abgeschwächten Anstieg dieser Modifikation rund um den TKS von *SAG12* im S1-Stadium kommt. Allerdings sind die H3K4me3-Ausgangsmengen insbesondere an der *SAG12-I*-Region im NS-Stadium der *SUVH2*-oe-Linie im

Vergleich zum WT bereits erhöht. Das stärkere Vorkommen von H3K4me₃ an *SAG12* in reifen Blättern der *SUVH2*-oe-Linie korreliert interessanterweise mit einer deutlich erhöhten Transkription des Gens im NS-Stadium im Vergleich zum WT. Dies impliziert, dass der repressive Chromatinzustand, der in reifen Blättern des WT vorliegt, durch ein erhöhtes Vorkommen aktivierender Chromatinmodifikationen wie H3K4me₃ in der *SUVH2*-oe-Linie aufgelockert sein könnte und so eine Transkription von *SAG12* bereits im NS-Stadium möglich wird (Abb. IV-1B). Allerdings konnten wie im WT auch die repressiven H3K9me₂- und H3K27me₃-Modifikationen in reifen Blättern der *SUVH2*-Überexpressionslinie detektiert werden. Darüber hinaus wurde für die *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen festgestellt, dass es im S1-Stadium nicht zu einem Verlust der repressiven Modifikationen wie im WT kommt. Dies könnte eine mögliche Ursache für die im Vergleich zum WT verringerte Induktion der Expression von *SAG12* in der *SUVH2*-oe-Linie sein. Dennoch muss festgehalten werden, dass es in dieser Linie zu einer deutlichen Expression von *SAG12* in beiden Stadien trotz des deutlichen Vorkommens der repressiven Histonmodifikationen kommt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die H3K27me₃-Modifikation nicht immer die Expression von Genen zu supprimieren scheint. So stellten Liu et al. (2014) für eine Reihe von H3K27me₃-modifizierten trockenstressassoziierten Genen fest, dass es zu einer transkriptionellen Aktivierung dieser Gene unter Trockenstress, unabhängig von einer Veränderung der H3K27me₃-Modifikation, jedoch in Korrelation mit einem Anstieg von H3K4me₃ kommt. Untersuchungen an Reis konnten ebenfalls zeigen, dass ein starkes Vorkommen der H3K4me₃-Modifikation dominant über H3K27me₃ zu sein scheint und dies eine weiterhin hohe Expression des Gens bewirken kann (He et al. 2010). Diese Daten indizieren, dass sowohl die absoluten als auch die relativen Niveaus von H3K4me₃ und H3K27me₃ die Transkription von Genen beeinflussen können. Im Übrigen stützt dies erneut die Annahme, dass beide Modifikationen am selben Gen koexistieren können. Ein Einfluss von H3K4me₃ wäre demnach auch für das H3K27me₃-markierte Gen *SAG12* denkbar und könnte zumindest teilweise die Änderungen der Expression in reifen und seneszenten Blättern in der *SUVH2*-oe-Linie erklären. Gleichzeitig muss in Betracht gezogen werden, dass mögliche Repressoren der *SAG12*-Transkription in ihrem Expressionsverhalten in reifen Blättern der *SUVH2*-oe-Linie beeinträchtigt sind. So ist es denkbar, dass die Überexpression von *SUVH2* zu einer Blockade putativer *SAG12*-Regulatoren in reifen Blättern führt und so ebenfalls an der verstärkten *SAG12*-Expression in reifen Blättern der *SUVH2*-oe-Linie beteiligt sein könnte (s. Abb. IV-1B).

Im WT wurden für das dritte *SAG ANAC083* nur leichte Veränderungen der untersuchten Histonmodifikationen während der Seneszenz detektiert (s. Kapitel III.3.2.2). Allerdings konnten in beiden untersuchten Stadien insbesondere im kodierenden Bereich des Gens deutliche Mengen aktivierender Histonmodifikationen nachgewiesen werden. Demnach ist sowohl in reifen als auch seneszenten Blättern ein Chromatinzustand etabliert, der die Transkription des Gens ermöglicht (transkriptionskompetenter Chromatinzustand; s. Abb. IV-1C).

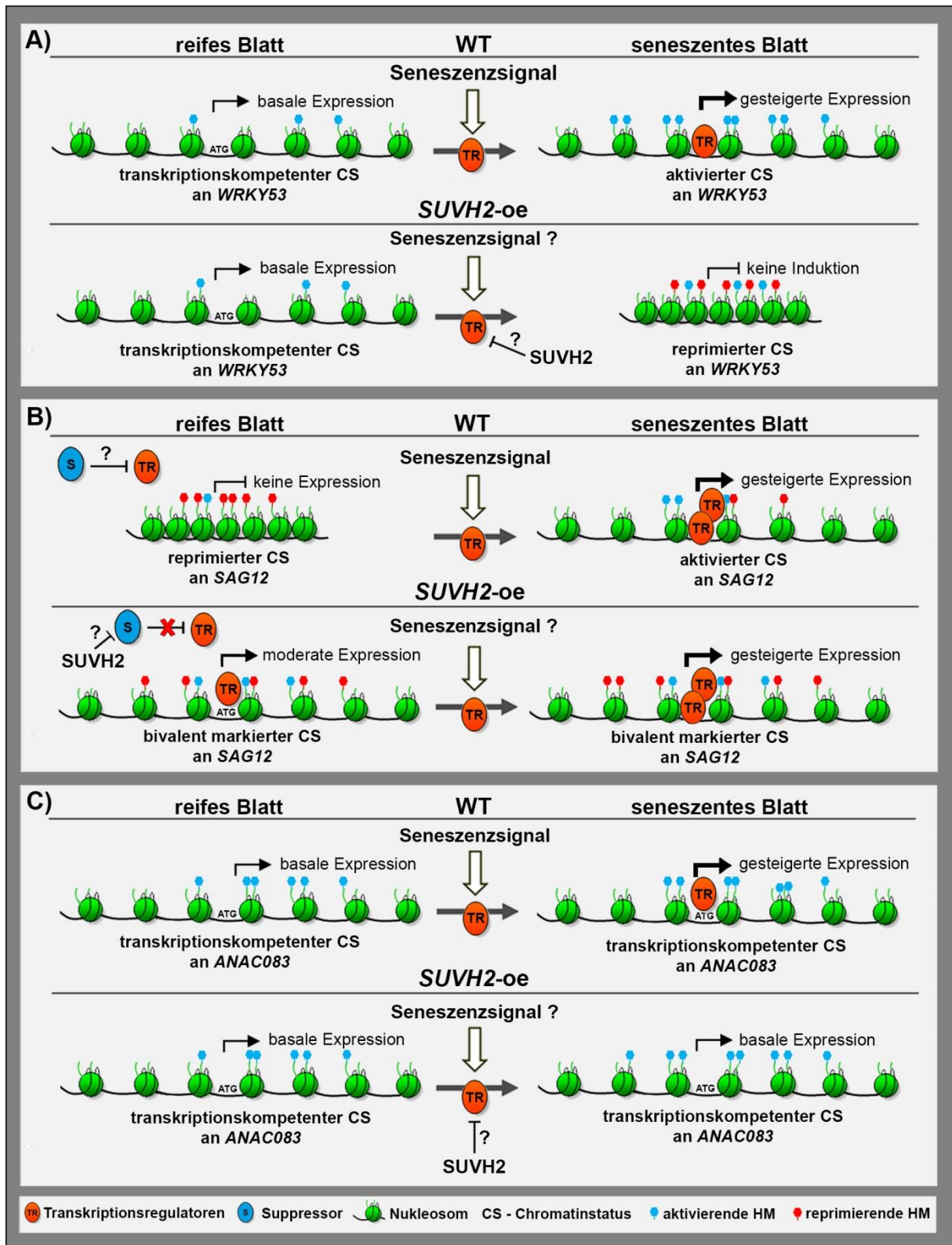


Abbildung IV-1: Der Einfluss von Chromatinmodifikationen auf die Expression von Seneszenzmarkergenen in Arabidopsis WT- und SUVH2-Überexpressionspflanzen während der Seneszenz. In dem Modell sind schematisch die Veränderungen des Expressionsverhaltens sowie der Histonmodifikationsmuster der drei SAG Markergene *WRKY53* (A), *SAG12* (B) sowie *ANAC083* (C) für den WT und die *SUVH2-oe*-Linie zusammengefasst. (HM) Histonmodifikation.

Da allerdings *ANAC083* in reifen Blättern des WTs nur schwach exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass seneszenzabhängig *upstream* Regulatoren des Gens wichtig für den Anstieg der Expression sind. Verglichen mit dem WT wurden für die *SUVH2*-Überexpressionslinie ein leichter Anstieg der beiden repressiven Modifikationen (H3K9me2 und H3K27me3) im S1-

Stadium sowie ein geringeres Vorkommen der H3K4me3-Modifikation im NS-Stadium an der *ANAC083-I*-Region nachgewiesen. Darüber hinaus ergab die Untersuchung der Nukleosomendichte für diesen *ANAC083*-Bereich eine signifikante Erhöhung der über den H3C-Antikörper immunopräzipitierten DNA (s. Appendix A.4; Abb. A-6). Daraus können zwei verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen spiegelt das erhöhte H3-Vorkommen eine Verdichtung des Chromatins an diesem Bereich wieder. Dies könnte in einer Beeinträchtigung der Initiation der *ANAC083*-Transkription im S1-Stadium resultieren. Zum anderen muss dabei beachtet werden, dass dementsprechend in diesem Bereich auch mehr modifiziertes Histon H3 vorliegen kann, was ursächlich für die leichten Anstiege der H3K4me3- sowie der repressiven H3-Modifikationen sein könnte. Folglich würde es sich dann nicht um neu etablierte Modifikationen an *ANAC083-I* handeln. Bislang ist unklar, ob die leichten Veränderungen des Chromatinzustandes an diesem SAG für die verzögerte Induktion der Expression dieses Gens in der *SUVH2*-oe-Linie sind oder nicht. Neben einer möglichen Verdichtung des Chromatins an *ANAC083-I* ist es z.B. auch möglich, dass die verringerte Induktion von *ANAC083* auf einer veränderten Expression von *upstream* Komponenten in der *SUVH2*-oe-Linie basiert (s. Abb. IV-1C).

IV.5 Identifizierung regulatorischer Faktoren der Seneszenz als mögliche Ziele lokaler Chromatinveränderungen durch die *SUVH2*-Überexpressionslinie.

Für weit über 100 TFs konnte bereits eine veränderte Expression während der Blattseneszenz in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Die starke Verzögerung der Seneszenz in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen sowie die beobachteten globalen Chromatinveränderungen indizieren, dass es möglicherweise an weiteren TF-kodierenden Genen, neben *WRKY53*, zu Veränderungen der Histonmodifikationsmuster kommen könnte, die mit einer Änderung der Expression einhergehen. Daher wurde die *SUVH2*-Überexpressionslinie als „Werkzeug“ genutzt, um gezielt weitere regulatorische Faktoren der Blattseneszenz zu identifizieren, die über Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur reguliert sein könnten. Dazu erfolgte der Vergleich der Expressionsdaten von über 1800 TFs und anderen regulatorischen Faktoren (RFs) zwischen dem S1- und dem NS-Stadium zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie unter Verwendung einer erweiterten Version der Expressionsprofiling-Plattform von Czechowski et al. (2004). Innerhalb dieser Analysen konnte im WT für 383 Gene eine differentielle Expression im S1-Stadium im Vergleich zum NS-Kontrollstadium festgestellt werden (s. Kapitel III.5.2). Von diesen Genen, die als SARFs (*senescence associated regulatory factors*) bezeichnet wurden, wiesen 314 Gene einen signifikanten, mindestens vierfachen Anstieg der relativen Transkriptgehalte im S1-Stadium auf (SURFs, *senescence upregulated regulatory factors*). Dagegen zeigten 69 Gene im S1-Stadium eine signifikante Verringerung der relativen Transkriptgehalte um mindestens das 0,25fache (SDRFs, *senescence downregulated regulatory factors*). Der Vergleich dieser Ergebnisse

mit verfügbaren Expressionsdaten, die entweder aus Microarrayanalysen (Buchanan-Wollaston et al. 2005; Breeze et al. 2011; Schmid et al. 2005; van der Graaff et al. 2006) oder ebenfalls aus qRT-PCR-Analysen (Balazadeh et al. 2008) stammen, ergab eine große Übereinstimmung mit den bislang publizierten Daten. Dennoch wurden 60 der in dieser Arbeit identifizierten SURFs bislang in keinem der entsprechend veröffentlichten Expressionsexperimenten als SAGs identifiziert. Dies könnte u. a. in voneinander abweichenden Anzuchtmethoden der Pflanzen für die Experimente, unterschiedlichem Blattmaterial, unterschiedlichen Seneszenzstadien, die untersucht wurden oder in der differierenden Sensitivität von Microarray- und qRT-PCR-Ansätzen begründet sein. Weitere gezielte Expressionsanalysen dieser 60 Gene sollten zukünftig überprüfen, ob es sich tatsächlich um neue SAGs handelt. Der Vergleich der Expressionsmuster der 383 SARFs mit den Expressionsdaten der *SUVH2*-oe-Linie in den zwei korrespondierenden Entwicklungsstadien ergab, dass etwa 50% aller seneszenzabhängig im WT regulierten TFs Unterschiede im Expressionsverhalten in der *SUVH2*-oe-Linie aufweisen (s. Kapitel III.5.3). Dagegen zeigte die Gegenüberstellung der Expressionsdaten in den einzelnen Stadien zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie, dass trotz der konstitutiven Überexpression von *SUVH2* nur 89 der 1156 untersuchten Gene eine signifikant unterschiedliche Expression im NS-Stadium aufweisen, während 202 Gene unterschiedlich stark im S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie im Vergleich zum WT exprimiert werden. Die sehr große Überlappung der Expressionsmuster der Gene im NS-Stadium war überraschend, da die *SUVH2*-oe-Pflanzen neben dem Seneszenzphänotyp auch durch eine Vielzahl pleiotroper Effekte, wie starkem Kleinwuchs, deformierten Blättern oder einer verringerten Fertilität, gekennzeichnet sind. Die im Gegensatz dazu deutlich höhere Anzahl der im S1-Stadium unterschiedlich exprimierten Gene indiziert, dass insbesondere TFs, die Seneszenzprozesse regulieren, durch die Überexpression von *SUVH2* beeinflusst sind.

IV.5.1 Untersuchungen zum Einfluss der *SUVH2*-Überexpression auf die Regulation von Genfamilien.

In einigen großangelegten Expressionsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte Genfamilien TF-kodierender Gene überrepräsentiert häufig während der Seneszenz reguliert sind (Balazadeh et al. 2008; Breeze et al. 2011). Breeze et al. (2011) zeigten dabei unter Nutzung von Microarrays, dass insbesondere Mitglieder der AP2-EREBP-, bZIP-, C3H-, CCAAT-DR1-, CCAAT-HAP2-, NAC- sowie WRKY-TF-Familien innerhalb der Seneszenz heraufreguliert werden. Die Ergebnisse der Überrepräsentationsanalyse anhand der innerhalb dieser Arbeit erhaltenen Expressionsdaten der qRT-PCR-Expressionsplattform zeigten für die CCAAT-HAP2-, NAC- und WRKY-TF-Familien ebenfalls eine signifikante Überrepräsentation in WT-Pflanzen (s. Kapitel III.5.4). Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung mit den Daten von Breeze et al. (2011) festgestellt werden, dass eine große Anzahl der AP2-EREBP-, bZIP- und C3H-TF-kodierenden Gene seneszenzabhängig induziert werden. Für die drei im WT überrepräsentiert

häufig regulierten TF-Familien zeigte sich ebenfalls eine signifikante Häufung für die *SUVH2*-oe-Linie. Allerdings war für die NAC- und WRKY-TF-Familie sowie forcierter für die AP2-EREBP-, bZIP-, C2H2-Familie feststellbar, dass deutlich weniger Mitglieder in der *SUVH2*-oe-Linie reguliert waren als im WT. So wurden zwischen 20 und 50 % der SURFs dieser TF-Familien nicht in der *SUVH2*-oe-Linie im untersuchten S1-Stadium heraufreguliert, während andere Familien, wie die CCAAT-HAP2- oder HB-Familie, kaum Unterschiede zum WT aufwiesen. Für die SDRFs ergab die Überrepräsentationsanalyse für keine der untersuchten Familien eine signifikante Auffälligkeit im WT oder der *SUVH2*-oe-Linie. Die am stärksten im WT betroffenen Familien waren die großen Familien der AP2-EREBP- und bHLH-TFs. So ergab der Vergleich, dass weniger als 20% der im WT als SDRFs identifizierten Gene auch in der *SUVH2*-oe-Linie reprimiert wurden und zeigt, dass die große Mehrheit der SDRFs deutlich durch die Überexpression von *SUVH2* beeinflusst wird. Dabei sind fast alle TF-Familien betroffen, wenngleich sich die stärksten Effekte für die bHLH- und die C2C2-GATA-TF-Familie ergaben. Insgesamt kann aus diesen Analysen geschlossen werden, dass sich insbesondere unter den stark beeinflussten Familien eine Vielzahl von Genen befinden könnte, die durch die Überexpression von *SUVH2* und somit über artifizielle Veränderungen der Chromatinstruktur reguliert sein könnten. Solche Gene tragen möglicherweise spezifische Erkennungssequenzen, wodurch *SUVH2* über direkte oder indirekte Wirkungen die Genexpression beeinflussen kann. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Überexpression von *SUVH2* keinen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von etwa 50% aller SARFs nimmt.

IV.5.2 Die Überexpression von *SUVH2* hat unterschiedliche Auswirkungen auf das Expressionsverhalten von SARFs.

Um zu untersuchen, ob es Gruppen von Genen gibt, die unterschiedlich durch die Überexpression von *SUVH2* beeinflusst sind, erfolgten Clusteranalysen der 383 als differentiell im WT regulierten SARFs unter Verwendung der korrespondierenden Expressionsdaten des WTs und der *SUVH2*-oe-Linie (s. Kapitel III.5.5). Diese Analysen ergaben fünf distinkte Cluster, deren zugeordnete Gene durch unterschiedliche Expressionsmuster gekennzeichnet waren. Dabei gruppierten die SURFs, für die keine deutlichen Unterschiede der Transkriptgehalte in der *SUVH2*-oe-Linie im NS- sowie im S1-Stadium im Vergleich zum WT festgestellt wurden, in ein gemeinsames Cluster (Cluster 4). Diese Gruppe von Genen machte etwa 50% der identifizierten SURFs aus und bildete damit das größte der fünf Cluster. Die restlichen Gene verteilten sich in Abhängigkeit der Transkriptgehalte in der *SUVH2*-oe-Linie im NS- und/oder dem S1-Stadium im Vergleich zum WT in weitere vier Cluster. Alle im WT herunterregulierten Gene (SDRFs) waren dem Cluster 1 zugeordnet. Für dieses Cluster war auffällig, dass die Mehrheit der Gene keine oder eine stark verminderte Repression im S1-Stadium der *SUVH2*-Überexpressionslinie aufwies, was sich bereits in dem Vergleich der Expressionsdaten (s. Kapitel III.5.3) sowie der Überrepräsentationsanalyse zeigte (s.

Kapitel III.5.4). Alle im WT heraufregulierten und in der *SUVH2*-oe-Linie verändert exprimierte Gene wurden in die Cluster 2, 3 und 5 eingruppiert. Interessanterweise ergaben die Analysen, dass die Veränderungen der Expression in der *SUVH2*-oe-Linie tatsächlich auf verschiedenen Ursachen basierten. In Abbildung IV.2 sind die Unterschiede des Expressionsverhaltens der SURFs in der *SUVH2*-oe-Linie, die für die Zuordnung in die Cluster verantwortlich sind, schematisch hervorgehoben. So zeigte sich für alle dem Cluster 2 zugeordneten Gene, dass die Transkriptgehalte im NS-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie sich nicht von denen des WT unterscheiden, dass allerdings die seneszenzabhängige Induktion für diese Gene inhibiert ist. Weiterhin war für dieses Cluster auffällig, dass eine große Anzahl von Genen, die der WRKY-, NAC-, C2H2-, und AP2-EREBP-Genfamilien zugehörig sind, dieser Gruppe zugeordnet wurde. Viele bekannte und wichtige Gene, die für seneszenzassoziierte TFs kodieren wie das in der Arbeit untersuchte *WRKY53*-Gen (Miao et al. 2004), *JUB1/ANAC042* (Wu et al. 2012) oder *WRKY70* (Besseau et al. 2012) clusterten in dieser Gruppe. Bei diesen Genen verursacht die Überexpression von *SUVH2* demnach entweder direkt oder indirekt eine deutliche Suppression der seneszenzabhängigen Induktion. Im Gegensatz dazu wurde für die Cluster 3-assoziierten Gene gezeigt, dass die verringerte Induktion der Expression in der *SUVH2*-oe-Linie vor allem auf einen bereits im NS-Stadium erhöhten Transkriptgehalt basiert. Demnach liegt nahe, dass die gestörte Regulation dieser SURFs insbesondere auf Einflüssen, die bereits in reifen Blättern durch die Überexpression von *SUVH2* initiiert wurden, begründet ist. Diese Veränderung des Expressionsverhaltens in nicht seneszenten Blättern konnte bereits für die SAG-Markergene *SAG12*, *FRK1* sowie *MYB13* beobachtet werden (s. Kapitel III.4.3.1; Abb. III-12). Es handelt sich dabei demnach nicht um einen seltenen, sondern einen relativ häufigen Effekt der Überexpression von *SUVH2* da mehr als 10% der SURFs eine veränderte Expression in reifen Blättern aufweisen. Dabei ist erstaunlich, dass es sich bei mehr als 55% aller in reifen Blättern in der *SUVH2*-oe-Linie signifikant stärker exprimierten Genen (s. Kapitel III.5.3; Abb. III-25) tatsächlich um SURFs handelt, die dem Cluster 3 zugeordnet wurden. Die Gründe für die Aktivierung dieser Gene in einem Entwicklungsstadium, bei dem die Expression im WT supprimiert ist, sind momentan noch unklar. So gibt es bislang keine Indikation dafür, dass *SUVH2* einen direkten positiven Effekt auf die transkriptionelle Regulation von Genen haben könnte. Ein möglicher Grund für die erhöhte Transkription der Cluster 3-Gene in der *SUVH2*-oe-Linie wäre aber z.B., dass es durch die Überexpression von *SUVH2* zu einer Suppression der Transkription von möglichen Repressoren der Cluster 3-Gene kommt. Für dieses Cluster konnte weiterhin festgestellt werden, dass auffällig viele Gene, die für TFs der AP2-EREBP-Familie kodieren, zugeordnet sind. Demnach könnten insbesondere für die Regulation dieser TF-Familie wichtige *upstream* Komponenten durch die *SUVH2*-Überexpression beeinflusst sein.

Eine dritte Gruppe von Genen, die in der *SUVH2*-oe-Linie ein unterschiedliches Expressionsverhalten im Vergleich zum WT aufwies, wurde in Cluster 5 zusammengefasst. Für

dieses Cluster ist typisch, dass die Expression in den *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen mehr oder weniger stark in beiden untersuchten Stadien im Vergleich zum WT erniedrigt ist. Dabei sind diesem Cluster gehäuft Gene zugeordnet, die für NAC-, WRKY- und C2H2-TFs kodieren. Die veränderte Expression dieser Faktoren in beiden Entwicklungsstadien indiziert, dass die Regulation dieser Gene sowohl in reifen als auch seneszenten Blättern der *SUVH2*-oe-Linie durch direkte und/oder indirekte Effekte der Überexpression von *SUVH2* beeinflusst werden.

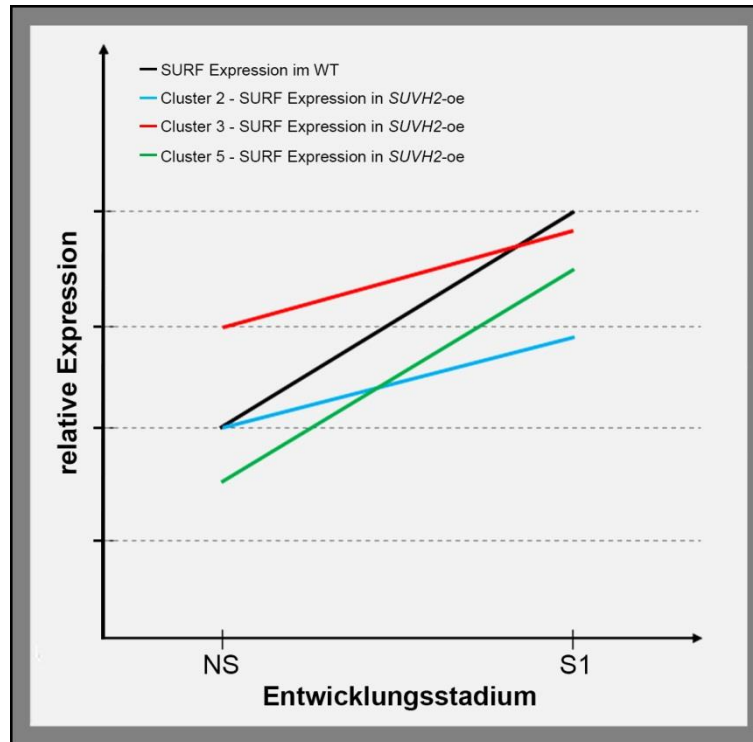


Abbildung IV-2: Schematische Darstellung der clusterspezifischen Veränderungen der SURF-Expression in *SUVH2*-oe-Pflanzen im Vergleich zum WT.

Die Veränderungen der Genexpression aller in der *SUVH2*-oe-Linie verändert exprimierten Gene führen letztlich zu der deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz. Um die Anzahl der möglicherweise über Chromatinveränderungen regulierten SURFs weiter einzuschränken, erfolgte die Analyse des Expressionsverhaltens durch qRT-PCR ausgewählter Cluster 2-, 3- und 5-gruppierter Gene in einer erweiterten Seneszenzkinetik (s. Kapitel III.5.6). Dabei wurde insbesondere auf Cluster 2-Gene fokussiert, da sich für *WRKY53*, das ebenfalls diesem Cluster zugeordnet ist, die größten Effekte der zwei in den ChIP-Analysen untersuchten TFs (*ANAC083* und *WRKY53*) auf Chromatinebene gezeigt hatten. Insgesamt erfolgten dabei die Expressionsstudien für die zehn am stärksten in der *SUVH2*-oe-Linie supprimierten Cluster 2-Gene in den drei Seneszenzstadien S0, S1, S2 (WT) sowie S3 (*SUVH2*-oe-Linie). Des Weiteren erfolgten diese Analysen jeweils auch für einen Vertreter der ebenfalls interessanten Cluster 3 und 5. Bei sieben der insgesamt zwölf Gene handelte es sich um bereits bekannte seneszenzassoziierte Gene wie z.B. *WRKY54* und *WRKY70*. Neben diesen bekannten SAGs wurde auch die Expression von fünf putativ neuen SURFs untersucht. Diese kodieren für einen ABI3VP1 (AT4G34400)-, einen AP2-EREBP- (AT1G74930; OCTADECANOID DERIVATIVE-RESPONSIVE AP2/ERF-domain

TF 47; *ORA47*), einen C2H2 (AT5G04390)-, einen MYB (AT3G10590) sowie einen RWP-RK Domänen (AT2G43500)-TF. Die Analysen ergaben, dass alle Cluster 2-Gene auch in den späten Seneszenzstadien S2 und S3, bei denen es auch in der *SUVH2*-oe-Linie zu deutlichen Seneszenzerscheinungen kommt, entweder eine stark reprimierte oder eine deutlich verzögerte Induktion der Expression aufweisen (s. Kapitel III.5.6.1; Abb. III-27 und 28). Eine besonders forcierte Suppression der seneszenzabhängigen Induktion in der *SUVH2*-oe-Linie konnte z.B. für *WRKY44* festgestellt werden. *WRKY44* kodiert für einen TF, der u. a. an der Regulation der Proanthocyaninsynthese beteiligt ist (Johnson et al. 2002). Erst kürzlich publizierte Daten von Xu et al. (2013) zeigen, dass *WRKY44* an der Regulation der Expression von *TT8* (*TRANSPARENT TESTA 8*) involviert ist. *TT8* wiederum kodiert für einen bHLH-TF, der ebenfalls an der Regulation der Proanthocyaninsynthese beteiligt ist (Lepiniec et al. 2006; Baudry et al. 2006). Interessanterweise konnte in den qRT-PCR-Expressionsprofilingsversuchen auch für *TT8* im S1-Stadium für den WT, allerdings nicht die *SUVH2*-oe-Linie, ein deutlicher Anstieg der Transkriptgehalte festgestellt werden (Ay et al. 2014b; *Supplementary DS 1d*). *TT8* ist u. a. an der Regulation der Anthocyan- und der Proanthocyanbiosynthese beteiligt (Zhang et al. 2003). Innerhalb der Regulation dieser Prozesse sind ebenfalls die homologen MYB-TFs *MYB75* (*PAP1*) und *MYB90* (*PAP2*) beteiligt (Baudry et al. 2006; Zimmermann et al. 2004). Für *MYB75* und *MYB90* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1* (*PAP1*) und *PAP2*) konnte eine Funktion als positive Regulatoren der Anthocyanbiosynthese nachgewiesen werden. So akkumulieren Anthocyane in Überexpressionslinien beider Faktoren (Borevitz et al. 2000; Maier et al. 2013). Anthocyane sind eine Gruppe der Flavonoide, die unter verschiedenen Stressbedingungen und während der Seneszenz akkumulieren (Hoch et al. 2003; Diaz et al. 2006). Für beide MYB-TFs konnte im WT eine sehr starke Induktion für das S1-Stadium detektiert werden. Darüber hinaus war die Expression dieser TFs in *SUVH2* überexprimierenden Pflanzen deutlich supprimiert (s. Kapitel III.5.6.2; Abb. III-28 sowie Ay et al. 2014b). Interessanterweise konnte in genomweiten ChIP-Analysen eine Assoziation beider MYB-Faktoren mit der repressiven H3K27me3-Modifikation nachgewiesen werden (Roudier et al. 2011; Zhang et al. 2007). Sowohl für *MYB75* als auch *MYB90* konnten Promotor-GUS-Studien eine hohe Aktivität der Gene während der Seneszenz und während Stress in den Zellen in und um die Leitgewebe herum nachweisen (Warner 2008). Diese gewebspezifische Regulation korreliert mit der Assoziation der beiden Gene mit H3K27me3 modifiziertem Chromatin, da für diese Histonmethylierung eine Assoziation mit gewebeabhängiger Expression korreliert wird (Zhang et al. 2007; Turck et al. 2007). Beide Gene stellen demnach interessante Kandidaten für die zukünftigen Analysen dieser und anderer Histonmodifikationen während der Seneszenz durch ChIP dar. Vergleichende Metabolomstudien in WT- und *SUVH2*-oe-Pflanzen in Kombination mit Expressions- und Histonmodifikationsanalysen könnten zudem weiter aufklären, ob tatsächlich Veränderungen des Chromatins an der Regulation des seneszenzassoziierten Flavonoidstoffwechsels beteiligt sind.

IV.5.3 HY5: ein putativer *upstream* Regulator der Seneszenz und seine Zielgene werden stark durch die Überexpression von *SUVH2* beeinflusst.

Neben MYB75 und MYB90 konnte eine Beteiligung weiterer TFs an der Regulation der Anthocyanbiosynthese, wie z.B. von HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5), nachgewiesen werden (Shin et al. 2007). Zudem konnten Shin et al. (2013) zeigen, dass HY5 direkt an G- und ACE-Boxen des *MYB75* Promotors binden kann und postulieren folglich die mögliche Rolle von HY5 als *upstream* Regulator der *MYB75* Transkription. Demnach könnte HY5 an der Kontrolle der Akkumulation von Anthocyanen während der Seneszenz beteiligt sein. Interessanterweise konnte in den innerhalb der Arbeit durchgeführten TF-Plattformprofilingsanalysen *HY5* als SURF identifiziert werden. Dabei weist der TF eine deutliche Suppression der Initiation der Expression im S1-Stadium in der *SUVH2*-oe-Linie auf und ist folglich in den Clusteranalysen wie *WRKY53* dem Cluster 2 zugeordnet. qRT-PCR-Analysen der *HY5*-Expression in der detaillierten Seneszenzkinetik ergaben zudem, dass die Suppression von *HY5* bis in späte Stadien der Seneszenz aufrechterhalten bleibt (s. Kapitel III.5.7). *HY5* kodiert für einen bZIP-TF, der wichtige Funktionen innerhalb von Entwicklungs- und Photomorphogeneseprozessen hat (Koornneef und van der Veen 1980; Osterlund et al. 2000; Chen et al. 2013; Lee et al. 2007). Untersuchungen von Charron et al. (2009) konnten für die lichtabhängige Genregulation von *HY5* selbst und von *HY5*-Zielgenen eine Beteiligung der H3K9ac-Histonmodifikation nachweisen. Demnach ist auch für die Regulation der seneszenzabhängigen Expression von *HY5* und *HY5*-Zielgenen eine Funktion differentieller Histonmodifikationen denkbar. Über einen CHIP-Chip-Ansatz von Lee et al. (2007) konnten über 3800 putative Zielgene des *HY5*-TFs identifiziert werden. Unter diesen Genen befanden sich u. a. neben *WRKY53* auch andere Cluster 2-assoziierte Gene, wie *WRKY44* und *WRKY70* sowie *ANAC081* und *ANAC104*. Ein Vergleich der Daten von Lee et al. (2007) mit den Expressionsdaten der qRT-PCR-Plattform ergab, dass 125 der 383 SARFs (~33%) putative *HY5*-Zielgene darstellen (s. Kapitel III.5.7). Demnach ist es möglich, dass dieser TF an der Regulation von etwa einem Drittel aller als SARFs identifizierten Gene involviert sein könnte. Vergleichende Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit zeigten zudem, dass sich insbesondere unter den SURFs gehäuft *HY5*-Zielgene befinden (s. Kapitel III.5.9; Tab. III.4). Als übergeordneter Regulator der Photomorphogenese ist es denkbar, dass *HY5* als ein wichtiger Integrator des Umweltfaktors Licht innerhalb der komplexen Regulation der Blattseneszenz fungieren könnte. Weiterhin wurde in der Arbeit festgestellt, dass insbesondere unter den stark in der Seneszenz regulierten TF-Familien (AP2-EREBP, NAC und WRKY) *HY5*-Zielgene vertreten sind (s. Kapitel III.5.9; Tab. III.5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich SARFs der AP2-EREBP-, C2H2-, NAC- und WRKY-Familien, die auch als *HY5*-Zielgene identifiziert wurden, eine veränderte Expression in der *SUVH2*-oe-Linie aufweisen (s. Kapitel III.5.9; Tab. III.6). Demnach könnte die Suppression von *HY5* in der *SUVH2*-oe-Linie z.T. zu einer verringerten oder völlig unterdrückten Aktivierung der Transkription von *HY5*-Zielgenen führen. Demnach wäre es wichtig zu klären,

welche der putativen Zielgene tatsächlich während der Seneszenz durch HY5 reguliert werden. Darüber hinaus sollten zukünftig Untersuchungen der Histonmodifikationsmuster über ChIP in WT und SUVH2 überexprimierenden Pflanzen an HY5 und den seneszenzabhängig regulierten Zielgenen erfolgen.

IV.5.4 EAR-Motiv enthaltene TFs bilden eine große Gruppe der SARFs und werden insbesondere durch die Überexpression von SUVH2 beeinflusst.

Kagale et al. (2010) identifizierten anhand einer genomweiten bioinformatischen Analyse in Arabidopsis insgesamt 219 regulatorische Faktoren, die ein sog. *ethylene-responsive element-binding factor-associated amphiphilic repression*-Motiv (EAR-Motiv) enthalten. Dieses Motiv ist aktiv an der Repression der Expression von Genen beteiligt. Dabei handelt es sich um das häufigste Transkriptionsrepressormotiv, das bislang in Pflanzen bekannt ist und das in insgesamt 21 verschiedenen Familien von RFs gefunden wurde (Kagale und Rozwadowski 2011). Das EAR-Motiv kommt besonders häufig in der C2H2- sowie der AP2-EREBP-TF-Familie vor. Viele Vertreter beider Familien zeigten eine seneszenzabhängige Regulation in den *Expressionsprofiling*-Analysen der qRT-PCR-Plattform (s. Kapitel III.5.4). Daher erfolgte der Vergleich der für den WT erhaltenen 383 SARFs mit den von Kagale et al. (2010) identifizierten EAR-Motivproteinen. Dabei zeigte sich, dass über 12% der SARFs (47 der 383 SARFs im WT) für EAR-Motivproteine kodieren (s. Kapitel III.5.8). Die genauere Betrachtung dieser „EAR-Motiv-SARFs“ ergab, dass diese insbesondere auf die Cluster 2, 3 und 5 verteilt waren (s. Kapitel III.5.9; Tab. III.4), was dafür spricht, dass vor allem Gene, die eine deutlich veränderte Expression in der SUVH2-oe-Linie aufweisen, für EAR-Motivproteine kodieren. Ein möglicherweise forcierter Einfluss der SUVH2-Überexpression auf die Transkription der EAR-Motivproteine wird auch dadurch untermauert, dass über 65% der SARFs mit einem EAR-Motiv eine veränderte Expression in der SUVH2-oe-Linie aufwiesen. Darüber hinaus zeigten die vergleichenden Analysen weiter, dass besonders viele Vertreter der AP2/EREBP-, C2H2, AUX/IAA- und MADS-TF-Familien, für die sich eine besondere Häufung des EAR-Motivs im WT ergab, eine veränderte Expression in der SUVH2-oe-Linie aufweisen (s. Kapitel III.5.9; Tab. III.5). Dies impliziert eine besondere Rolle dieser TF-Familien als mögliche Repressoren innerhalb der Regulation der Blattseneszenz. Eine Bedeutung einzelner EAR-Motiv enthaltender TFs innerhalb von Seneszenzprozessen konnte bereits in einigen neueren Studien gezeigt werden. Beispielsweise wurde über heterologe Expression des EAR-Motivproteins SIERF36 aus Tomate (*Solanum lycopersicum*), das unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors ektopisch in Tabak exprimiert wurde, gezeigt, dass es in diesen Pflanzen zu einem verfrühtem Einsetzen des Blühens und einem entsprechend beschleunigten Beginn der Seneszenz kommt. Diese Phänotypen konnten auch für transgene Arabidopsis Pflanzen, die das vollständige SIERF36-Protein exprimierten, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen transgene Pflanzen, die ein SIERF36-Protein überexprimierten, in dem das EAR-Motiv deletiert

war, nicht diese phänotypischen Erscheinungen auf (Upadhyay et al. 2014). Des Weiteren konnten Studien in Arabidopsis von Koyama et al. (2013) die Beteiligung von ERF4 und ERF8, zwei seneszenzassoziierten EAR-Motivproteinen, an der Regulation von *ESP/ESR* zeigen. *ESP/ESR* (EPITHIOSPECIFYING SENESCENCE REGULATOR) selbst hat einen seneszenzverzögernden Einfluss, in dem es die Aktivität des positiven Seneszenzregulators WRKY53 inhibiert (Miao und Zentgraf 2007). Zudem konnten sie feststellen, dass Überexpressionspflanzen von ERF4 und ERF8 durch eine beschleunigte Seneszenz sowie die Initiation der Expression von WRKY-Genen wie *WRKY30*, *WRKY53* oder *WRKY75* gekennzeichnet waren, während für *erf4* und *erf8* Transgene eine Verzögerung der Seneszenz detektiert wurde. Koyama et al. (2013) schlussfolgern aus ihren Daten, dass ERF4 und ERF8 durch die Repression von *ESP/ESR* an der Aktivierung von WRKY53 und damit am Fortschreiten der Seneszenz beteiligt sein könnten. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass EAR-Motiv Repressorproteine eine wichtige Funktion innerhalb der Koordination von Umwelt- und Entwicklungssignalen über die Rekrutierung von Co-Repressoren, wie SAP18 (SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE 18) oder TPL (TOPLESS), die wiederum eine HDA-vermittelte Chromatinmodifizierung von Zielgenen sowie deren *Silencing* ermöglichen, umsetzen [zusammengefasst in Kagale und Rozwadowski (2011)]. Die beachtliche Anzahl der EAR-Motivproteine unter den SARFs sowie der starke Einfluss der *SUVH2*-Überexpression auf diese Gene indiziert eine Beteiligung chromatinmodifizierender Proteine in Repressorkomplexen und somit die Funktion dieser Proteine innerhalb der zeitlichen Steuerung der seneszenzabhängigen Genregulation. Zukünftig sollten Chromatinuntersuchungen an in der *SUVH2*-oe-Linie verändert exprimierten Genen, wie *ERF4* erfolgen, um die Beteiligung von Chromatinmodifikationen an der Regulation dieser Subklasse von seneszenzassoziierten TFs zu untersuchen. Auch wäre es interessant, die Zielgene der über Chromatinveränderungen regulierten EAR-Motivproteine zu identifizieren und die Regulationskaskaden der Blattseneszenz weiter aufzuschlüsseln.

IV.6 Die Expression *SUVH2*-homologer Gene während der Seneszenz und der Einfluss der *SUVH2*-Überexpression.

Untersuchungen spezifischer Chromatinmodifikationen innerhalb dieser Arbeit demonstrierten, dass es global und lokal während der Seneszenz zu vielschichtigen Veränderungen der Chromatinstruktur kommt. Die Daten von Wu et al. (2008), die einen möglichen Einfluss der Histondeacetylase HDA6 auf Seneszenzprozesse indizieren, und die Untersuchungen über den Einfluss der ektopischen Expression der putativen Histonmethyltransferase *SUVH2* in dieser Arbeit zeigen, dass Eingriffe in das natürliche System von Faktoren, die an der Etablierung des Chromatins beteiligt sind, zu massiven Veränderungen der pflanzlichen Entwicklung und so auch der Seneszenz führen können. Bis heute gibt es eine kontroverse Diskussion darüber, ob *SUVH2 in vivo* eine Histonmethyltransferaseaktivität (HMTase) besitzt oder nicht (Naumann et al. 2005; Johnson et al. 2008). Daher ist bislang ungeklärt, ob die deutliche ektopische

Heterochromatisierung als Folge der Überexpression von SUVH2 direkt oder nur indirekt durch SUVH2 umgesetzt wird. Zweifelsohne konnte SUVH2 als wichtige Komponente für das transkriptionelle Gensilencing sowie die Aufrechterhaltung repressiver Histonmethylierungen identifiziert werden (Johnson et al. 2008; Kuhlmann und Mette 2012). Alles in allem lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass SUVH2 selbst keine HMTase-Aktivität besitzt und dass der faktische Anstieg heterochromatischer Histonmodifikationen wie H3K9me2 in SUVH2 überexprimierenden Pflanzen indirekt und demnach durch andere HMTasen realisiert wird. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte daher die Analyse, ob die Überexpression von SUVH2 die Expression anderer putativer H3K9me2-Methyltransferasen beeinflusst und wie sich die Expression dieser Gene im WT während der Seneszenz verhält. Neben *SUVH2* kodieren in Arabidopsis neun *SUVH*-Gene für orthologe Proteine der H3K9 Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 aus Drosophila und stellen so putative Kandidaten für Histonmethylierungen an H3K9 dar. In der Arbeit erfolgte die Analyse des Expressionsverhaltens aller zehn *SUVH*-Gene (*SUVH1-10*; s. Kapitel III.6). Für nur acht der zehn Gene (*SUVH1-6* und *SUVH8-9*) konnte eine Expression in Blättern in den untersuchten Stadien (NS, S0, S1, S2 für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie sowie S3 für die *SUVH2*-oe-Linie) nachgewiesen werden. Für *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH6* und *SUVH9* konnten keine seneszenzabhängigen Veränderungen der relativen Transkriptgehalte im WT oder in Folge der starken Überexpression von SUVH2 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war ein Absinken der relativen Transkriptgehalte von *SUVH2*, *SUVH4* sowie *SUVH5* im WT feststellbar. Bei *SUVH4* (KYP/ KRYPTONITE) und *SUVH5* handelt es sich neben *SUVH6* um die wichtigsten H3K9-Methyltransferasen in Arabidopsis (Jackson et al. 2002; Ebbs und Bender 2006; Ebbs et al. 2005). Die seneszenzabhängige Verringerung der Expression von *SUVH4* und *SUVH5* war darüber hinaus in den *SUVH2*-oe-Pflanzen weitestgehend unverändert. Demnach hat die Überexpression von SUVH2 wahrscheinlich weder einen Einfluss auf die Transkription von *SUVH1-3*, *SUVH4* sowie *SUVH5-6* noch auf die des endogenen *SUVH2*-Gens. Nur für einen Vertreter der SUVH-Familie, *SUVH8*, konnte im WT ein Anstieg der Expression während der Seneszenz festgestellt werden. Dabei war besonders interessant, dass in reifen Blättern (NS-Stadium) kein *SUVH8*-Transkript detektiert werden konnte, doch bereits im frühen S0-Stadium *SUVH8*-mRNA akkumulierte. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass dieser Anstieg in der *SUVH2*-Überexpressionslinie deutlich verzögert stattfindet. Bisher gibt es kaum Informationen für die biologische Bedeutung von *SUVH8*, möglicherweise aufgrund seiner extrem schwachen Expression in nicht seneszenten Blattstadien. Allerdings konnten kürzlich Manavella et al. (2013) zeigen, dass die *microRNA* miR171a* gewebsabhängig am *Silencing* von *SUVH8* beteiligt ist und dass diese Repression wichtig für eine normale Entwicklung von Arabidopsis ist. Die Bildung von miRNAs wird von verschiedenen Proteinen wie DCL1 (DICER-LIKE 1) reguliert. Für ein weiteres DCL-Protein, DCL2, das vor allem für die Generierung spezifischer siRNAs verantwortlich ist, konnte eine antagonistische Wirkung für die DCL1-vermittelte miRNA-Bildung nachgewiesen

werden (Bouche et al. 2006). Interessanterweise wurde erst kürzlich für eine *dcl2*-Mutante eine massive Induktion der *SUVH8*-Expression gezeigt (Migicovsky et al. 2014), was eine Funktion von DCL2 innerhalb der Regulation der *SUVH8*-Expression vermuten lässt. In genomweiten Untersuchungen an Arabidopsis Keimlingen konnte darüber hinaus ein Vorkommen der Trimethylierung von H3K27 an *SUVH8* nachgewiesen werden (Roudier et al. 2011), was eine Beteiligung dieser repressiven Histonmodifikation an der Regulation der entwicklungsabhängigen Expression dieses Gens indiziert. In zukünftigen Arbeiten wäre es u. a. aufschlussreich, die genauen Mechanismen der Kontrolle der *SUVH8*-Expression während der Seneszenz zu untersuchen sowie mögliche Zielsequenzen von *SUVH8* zu identifizieren. So könnten Hinweise auf die biologische Relevanz dieser putativen HMTase im Allgemeinen und insbesondere bezüglich der Seneszenz gewonnen werden.

Expressionsanalysen von Genen während der Seneszenz, die an der Etablierung des Chromatins beteiligt sind, können erste Hinweise für eine Involvierung der entsprechenden Genprodukte an der Regulation der Seneszenz liefern. Beispielsweise erfolgte durch Ay et al. (2014a) die gezielte Betrachtung der Expressionsmuster von mehr als 70 Genen, die an der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung involviert sind (Stroud et al. 2013). Diese Untersuchungen unter Verwendung der genomweiten Expressionsdaten von Breeze et al. (2011) zeigten, dass 14 Gene signifikant schwächer sowie zwei Gene deutlich verstärkt im Verlaufe der Seneszenz exprimiert werden. In zukünftigen Experimenten sollte aufgeklärt werden, ob die Veränderungen des Expressionsverhaltens dieser Gene sowie der *SUVH*-Gene eine biologische Relevanz für den Verlauf der Blattseneszenz haben oder nicht. Zukünftig müssen darüber hinaus natürlich Proteinexpressionsanalysen sowie Aktivitätsstudien erfolgen, um zu überprüfen, ob sich die beobachteten Effekte auf Transkriptebene entsprechend in veränderten Proteingehalten und/oder Enzymaktivitäten der einzelnen Faktoren widerspiegeln.

- V. MATERIAL & METHODEN -

V.1 Verwendete Materialien

V.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden zumeist von den Firmen AppliChem GmbH (www.applichem.com), Biozym Diagnostics GmbH (www.biozym.com), Calbiochem® (www.calbiochem.com), Carl Roth GmbH & Co. KG (www.carl-roth.de), Diagonal (www.diagonal.de), DUCHEFA BIOCHEMIE B.V (www.duchefabiochemie.com), MBI Fermentas GmbH (www.fermentas.de), Merck Eurolab GmbH (www.merckeurolab.de), Panreac Promega GmbH (www.promega.com), Roche (www.roche.com) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (www.sigma-aldrich.com) bezogen und zeichneten sich durch den Reinheitsgrad „*pro analysis*“ aus. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden mit autoklaviertem und entionisiertem Wasser (TKA GenPure; Thermo Electron LED GmbH ein Unternehmen von Thermo Fisher Scientific; <http://www.tka.de/>) hergestellt.

V.1.2 Enzyme und molekularbiologische „Kits“

Die verwendeten molekularbiologischen *Kits*, Restriktionsenzyme, DNase I sowie dNTPs wurden von den Firmen GE Healthcare Europe GmbH (www.gehealthcare.com), Invitex GmbH (www.invitex.de), Life Technologies (www.lifetechnologies.com), MBI Fermentas GmbH, Promega GmbH, QIAGEN GmbH (www.qiagen.com), Roboklon GmbH und Roche bezogen. Als DNA-Polymerase wurden hauptsächlich die *Color Taq* DNA Polymerase der Firma Roboklon GmbH (www.roboklon.de), die KAPAHiFi Uracil+ Polymerase der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (www.peqlab.de) und die TrueStart™-*Taq* Polymerase der Firma MBI Fermentas GmbH verwendet. Die eingesetzten Antikörper wurden von Abcam (www.abcam.com), GE Healthcare, Upstate (jetzt Merck Millipore zugehörig; www.emdmillipore.com) und Roche bezogen.

V.1.3 Größenstandards

Für die Größen- oder Längenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Agarose-Gelelektrophorese wurden „DNA-Leitern“ der Firma MBI Fermentas verwendet (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix ready-to-use* und *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use*). Die Bestimmung von Transkriptlängen in *Northern-Blot*-Analysen erfolgte mittels dem Digoxigenin-markierten „RNA-Längenstandard I (RNA I)“ der Firma Roche (0,3 bis 6,9 kb).

V.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins Genomics (<http://www.eurofinsgenomics.eu>) bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Appendix unter A.8 aufgeführt.

V.1.5 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für diese Arbeit verwendet:

Vektor	Besondere Merkmale	Verwendung / Referenz
pGEM®-T	Ampicillinresistenzkassette, T7- und SP6-RNA Polymerase Promotoren, die <i>multiple cloning site</i> (MCS) in der <i>lacZ</i> -Genregion (β -D-Galactosidasegen) flankieren; Selektionssystem: Durch Insertion in die im <i>lacZ</i> -Gen enthaltene MCS können direkt über Blau-Weiß-Screening mittels Indikatorplatten (X-Gal) positive Transformanten identifiziert werden.	T/A Klonieren von PCR Produkten, die 3'-A Überhänge haben / Promega GmbH
pJET1.2	Ampicillinresistenzkassette, T7 RNA Polymerase Promotor; MCS, Selektionssystem über <i>eco47IR</i> : ein sog. Todesgen, das durch die Ligation von DNA in die Klonierungsstelle zerstört wird. So sind nur Zellen mit rekombinierten Plasmiden teilungsfähig.	<i>Blunt end</i> -Klonierung von PCR-Produkten, die keine 3'-A-Überhänge generieren / Thermo Scientific (www.thermoscientificbio.com)

Tabelle V.1 Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

V.1.6 Bakterienstämme

Für Klonierungsansätze wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 α (Life Technologies; www.lifetechnologies.com) und XL1-Blue MRF' (Stratagene) verwendet.

Stamm	Genotyp
DH5 α ™	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
XL1-Blue MRF'	Δ (<i>mrcA</i>) 183 Δ (<i>mrcCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^q Z</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^R)]

Tabelle V.2 Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

V.1.7 Nährmedien für *Escherichia coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder in Flüssigkultur in LB-Medium (1 % (w/v) Bacto[®] trypton, 0,5 % (w/v) Bacto[®] yeast extract, 1 % (w/v) NaCl, pH 7) oder auf LB-Agarplatten (LB-Medium plus 1,5 % (w/v) Agar-Agar). Nach dem Autoklavieren und Abkühlen erfolgte gegebenenfalls die Zugabe von Selektionsagenzien: Antibiotika: 0,24 % (v/v) Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml); 0,3 % (v/v) Tetrazyklin-Stammlösung (5 mg/ml); Blau-Weiß-Screening: 12 % (v/v) X-Gal-Stammlösung (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid; 20 mg/ml gelöst in Demethylformamid).

V.1.8 Kulturmedien für die Anzucht von Arabidopsis

Arabidopsis-Samen wurden zunächst auf einem Festmedium nach (Murashige und Skoog (1962) zur Keimung gebracht, dieses enthielt 4,4 g/l MS-Salze (DUCHEFA); 8 g/l Agar-Select (GIBCO BRL) sowie 30 g/l Saccharose. Für die Selektion von hetero- bzw. homozygoten *suvh2*-GK-Pflanzen wurde das Antibiotikum 1 % (v/v) Sulfadiazin-Stammlösung (7,5 mg/ml) zugegeben. Obwohl das Überexpressionskonstrukt der *SUVH2*-oe-Linie eine Kanamycin-Resistenzkassette beinhaltet, erfolgte die Anzucht der heterozygoten Pflanzen ohne Selektion durch Antibiotika, da aufgrund des starken Kotyledonenphänotyps Überexpressionspflanzen eindeutig von WT-Pflanzen unterschieden werden konnten. Nach etwa einer Woche wurden die Keimlinge der Arabidopsispflanzen auf ein Gemisch aus drei Teilen Erde (Einheitserde Werkverband, TYP ED 73, pH 6,0) und einem Teil Vermiculit (2-3 mm Körnung, Marmullar, Witten) überführt und dort weiter kultiviert.

V.1.9 Pflanzenmaterial und Saatgut

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0 (Col-0) durchgeführt. Neben dem Wildtyp (WT) wurden zudem die T-DNA-Insertionslinien GABI-Kat_516A07 (*suvh2*-GK) sowie eine 35S*::*mycSUVH2#5* (*SUVH2*-oe) untersucht.

Linie *suvh2*-GK

Die verwendete GABI-Kat_516A07 (Ursprung: pAC161)-Mutante wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen und trägt 1937 bp nach dem Start-ATG bzw. 2051 bp nach dem TKS eine T-DNA Insertion. Die Selektion von Pflanzen mit hetero- bzw. homozygoter Insertion erfolgte zunächst auf MS-Sulfadiazin-Platten (s. Kapitel V.1.8). Pflanzen mit homozygoter T-DNA-Insertion in *SUVH2* wurden mittels PCR, unter Verwendung der in Abbildung VI-9B dargestellten Primerkombinationen, selektiert (Primersequenzen sind im Appendix unter A.8 aufgelistet): Primerkombination 1: spezifisch für das *SUVH2*-WT-Allel: P3.1 (*forward*) und P3.2 (*reverse*) sowie Primerkombination 2: P3.1 und P3.3 (GK_LB_o8409; spezifisch für die T-DNA). Um die Wahrscheinlichkeit anderer Mutationen zu minimieren, wurden ein Teil des Saatguts auf Erde angezogen und über PCR Pflanzen selektiert, die keine T-DNA-Insertion in *SUVH2* aufwiesen. Von diesen Pflanzen wurden Samen gewonnen und als die jeweiligen WT-Kontrollen für die Analysen der *suvh2*-GK-Linie verwendet. Alle nachfolgenden Experimente erfolgten an den homozygoten Nachkommen.

Linie *SUVH2*-oe

Die verwendete 35S*::*mycSUVH2#5*-Linie (*SUVH2*-oe) ist eine von drei unabhängigen, in der AG von Prof. Dr. Reuter (MLU Halle-Wittenberg) generierten, *SUVH2*-Überexpressionslinien, die alle einen mehr oder weniger stark ausgeprägten *mini plant* Phänotyp aufwiesen und für die die eindeutige Überexpression des *SUVH2*-Proteins gezeigt werden konnte (Naumann et al. 2005). Für die Erstellung der 35S*::*mycSUVH2*-Linien wurde die *SUVH2*-CDS über pGEM-T Klonierung in den binären pBI1.4tr-*myc* Vektor kloniert und über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Vakuum-Infiltration in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Col-0-Pflanzen transferiert. In diesen Pflanzen wird unter Kontrolle des konstitutiven 35S*-*CamV* (Cauliflower Mosaic Virus)-Promotors, ein *myc*-*SUVH2*-Fusionsprotein exprimiert. Die Aktivität des 35S*-Promotors ist dabei durch eine Modifizierung im Vergleich zum 35S-Promotor deutlich um etwa das 40fache reduziert (Mindrinos et al. 1994). Des Weiteren beinhaltet das generierte T-DNA-Konstrukt den Selektionsmarker für Kanamycin (*nptII*) sowie zwei Bordersequenzen (LB, *left border* und RB, *right border*). Für diese Linie ist gezeigt, dass es sich um eine Einfachinsertion der T-DNA handelt. Folgender Insertionsort konnte bestimmt werden: 35S*::*mycSUVH2#5*-Linie: Chromosom 3; Position 76360; Intergenischer Bereich. Für die *SUVH2*-oe-Linie erfolgten alle Analysen an zumeist heterozygoten Pflanzen.

V.2 Methoden

V.2.1 Anzuchtmethoden

Für die Anzucht von Arabidopsispflanzen wurden die Samen für 15 s mit 70 % Ethanol versetzt und danach ca. 10 min in Natriumhypochlorit-Lösung (Entkeimungslösung: 9% Natriumhypochlorid-Lösung, 0,5% Tween 20[®]) inkubiert (kurz schwenken). Nach der Entfernung der Entkeimungslösung folgten mehrere Waschschrte mit sterilem Wasser bis zum Verschwinden des Chlorgeruchs. Anschließend wurden die Samen auf MS-Saccharoseplatten (s. Kapitel V.1.8) verteilt. Für eine Synchronisierung der Keimung wurden die Samen für zwei Tage bei 4 °C abgedunkelt stratifiziert. Im Anschluss erfolgte die Keimung für etwa sieben Tage unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht [$\sim 150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$] bei ~ 23 °C und ~ 60 % Luftfeuchte sowie 8h Dunkelheit bei ~ 18 °C und

~60 % Luftfeuchte) in einer klimatisierten Gewächshauskammer. Die Keimlinge wurden dann einzeln in kleine Töpfe, die mit einem Gemisch aus Erde und Vermiculit gefüllt waren (s. Kapitel V.1.8), überführt und weiter unter den genannten Langtagbedingungen kultiviert.

V.2.2 Ernte des Pflanzenmaterials

Ernte für die Bestimmung des relativen Chlorophyllgehaltes

An jedem Untersuchungszeitpunkt wurden von je fünf bis zehn Pflanzen für jede zu analysierende Linie die Rosettenblätter 5 bis 8 (wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) von der restlichen Pflanze abgeschnitten, separat die Frischmasse bestimmt, in 2 ml Eppendorf Gefäße überführt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Ernte für die Bestimmung der PSII-Effizienz

An jedem Untersuchungszeitpunkt wurden von je fünf bis zehn Pflanzen für jede zu analysierende Linie die Rosettenblätter 5 bis 8 (wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) von der restlichen Pflanze abgeschnitten und auf mit Leitungswasser angefeuchtete MS-Platten gelegt und sofort für die Bestimmung der PSII-Effizienz weiter verwendet.

Ernte für T-DNA-Insertionstest und Northern-Blot-Analysen

16 Tage nach Aussaat wurde die gesamte Blattrosette von je fünf Pflanzen der zu untersuchenden Linien abgeschnitten und separiert sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Ernte für qRT-PCR, Transkriptionsfaktorplattform- und DNA-Methylierungsanalysen

Zu den physiologisch definierten Zeitpunkten wurden mehrfach je 100mg Blattmaterial (Rosettenblätter 5 bis 8, wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) von der restlichen Pflanze abgeschnitten und sehr schnell in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die

Ernte des Blattmaterials erfolgte dabei jeweils am Morgen immer im gleichen Zeitraum (zwischen 9 und 10 Uhr).

Ernte für immunozytologische Analysen

Zu den physiologisch definierten Zeitpunkten wurde das Blattmaterial (Rosettenblätter 5 und 6, wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) von der restlichen Pflanze abgeschnitten. Von diesen Blättern wurden kleinere Blattstücke jeweils seitlich der Mittelrippe ausgelöst, wobei jeweils nur mittlere Teile des Blattes für die folgenden Analysen verwendet wurde (Abb. V-1).

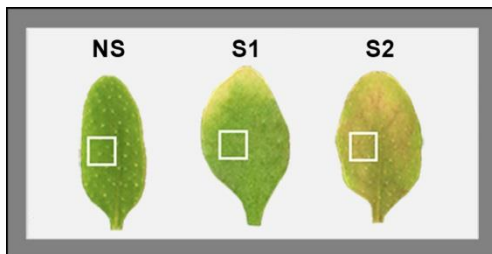


Abbildung V-1: Darstellung repräsentativer Arabidopsis Rosettenblätter (jeweils Blatt 6) unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Die weißen Vierecke markieren den Bereich der Blätter, der für die immunozytologischen Untersuchungen verwendet wurde.

Ernte für ChIP-Analysen

Zu den physiologisch definierten Zeitpunkten wurden je 1 g Blattmaterial (Rosettenblätter 5 bis 8, wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) von der restlichen Pflanze abgeschnitten und sehr schnell in mit eiskaltem sterilem Wasser gefüllte 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für die weiteren Schritte der ChIP verwendet. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte dabei jeweils am Morgen immer im gleichen Zeitraum (zwischen 10 und 11 Uhr).

V.2.3 Physiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Analysen dieser Arbeit war es notwendig, geeignete Stadien der Blattentwicklung physiologisch zu definieren. In Vorarbeiten wurde dazu der Verlauf der natürlichen Blattseneszenz durch die Bestimmung des relativen Chlorophyllgehaltes und der PSII-Effizienz aller zwei Tage dokumentiert und anhand der erhaltenen Daten fünf verschiedene Stadien der Blattentwicklung definiert. Die Messungen sowie Expressionsanalysen erfolgten an definierten Blättern (Blatt 5 bis 8, wobei die Kotyledonen als Blatt 1 bis 2 mitgezählt werden) für den WT, die Linie *SUVH2-oe* sowie die Linie *suvH2-GK*, um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten.

V.2.3.1 Messung des Chlorophyllgehaltes

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte die Isolierung der Chlorophylle mittels ammoniakalischer Aceton-Lösung (80 % (v/v) Aceton, 19,5 % (v/v) destilliertes Wasser und 0,5 % (v/v) konzentrierte [25 % w/v] NH_3 -Lösung). Zunächst wurde dazu die Frischmasse des Blattmaterials bestimmt und anschließend in ein 2 ml

Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial mittels Pistill gemörsert und je nach Frischmasse entsprechend Extraktionsmedium zugegeben. Die spektrophotometrische Bestimmung der Chlorophylle erfolgte mittels HP8452A Diode Array Spektrophotometer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach Schopfer (1989). Pro Messpunkt und biologischem Replikat wurden die Blätter 5 bis 8 von fünf bzw. zehn Einzelmessungen analysiert. Aus den erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel mit entsprechender Standardabweichung berechnet.

V.2.3.2 Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz als Maß der PSII-Effizienz

Die Messungen der PSII-Effizienz (= maximale Quantenausbeute des PS II = $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$) erfolgte mithilfe eines Imaging-PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) Chlorophyllfluorometers (Heinz Walz GmbH; www.walz.com). Der dabei bestimmte Parameter F_v/F_m ist ein Maß für die Quantenausbeute der PSII-Zentren. Für die Bestimmung des F_v/F_m wurden die Blätter für 10 min dunkeladaptiert. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Pro Messpunkt und biologischem Replikat wurden die Blätter 5 bis 8 von fünf bis zehn Pflanzen analysiert. Aus den erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel mit entsprechender Standardabweichung berechnet.

V.2.4 Definition der Entwicklungsstadien über physiologische Parameter

Unter Verwendung der zwei physiologischen Parameter Chlorophyllgehalt und PSII-Effizienz wurden fünf verschiedene Entwicklungsstadien definiert. Dabei wurden vier unterschiedliche Stadien der Seneszenz (S0, S1, S2 und S3), die auf ein Kontrollstadium (NS) bezogen werden sollten, wie folgt charakterisiert: Das Kontrollstadium ist durch einen maximalen Chlorophyllgehalt und eine maximale PSII-Effizienz definiert (beides entspricht maximalen Werten (100 %) als Ausgangspunkt). Im frühen Seneszenzstadium (S0) sinkt der Chlorophyllgehalt um etwa 10 % ab und die Chlorophyllfluoreszenz bleibt gleich. Das mittlere S1-Stadium ist gekennzeichnet durch ein Absinken der PSII-Effizienz um ca. 10 % sowie einen deutlichen Chlorophyllabfall von etwa 50 %. In der späten Phase der Seneszenz (S2) sind die PSII-Effizienz bereits um 50 % und der Chlorophyllgehalt auf etwa 75 % im Vergleich zur Kontrolle (NS) verringert. Das S3 Stadium zeichnet sich durch eine Verringerung der PSII-Effizienz in der Seneszenz verzögerten *SUVH2*-oe-Linie um 50 % aus, während sie beim WT zu diesem Zeitpunkt bereits 0 % beträgt. Das S3-Stadium der *SUVH2*-oe-Linie entspricht somit den Parametern des S2-Stadiums des WTs.

V.2.5 Molekularbiologische Methoden

V.2.5.1 Generelle molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie Arbeiten mit Restriktionsenzymen, Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) oder Transformationstechniken wurden, falls nicht anders erwähnt, nach Sambrook und Russel (2001) sowie Mülhardt (2006) durchgeführt.

V.2.5.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten über die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten erfolgte mittels PCR, unter Verwendung unterschiedlicher DNA-Polymerasen. Es sind dabei hauptsächlich die TrueStart Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific), die Color *Taq* DNA Polymerase (Roboklon GmbH) sowie der KAPA HiFi Uracil+ Hot Start ReadyMix (PEQLAB Biotechnologie GmbH) mit den jeweils mitgelieferten Puffern verwendet worden. In Abhängigkeit vom Versuch erfolgte die Bestimmung der optimalen Mg^{2+} -, dNTP- und Primerkonzentrationen. Zudem wurde in Abhängigkeit vom Experiment die eingesetzte *Template*-Menge, die Anlagerungstemperatur für die Primer sowie die Zyklenanzahl der PCRs individuell angepasst.

V.2.5.2.1 Kolonie-PCR

In Abhängigkeit vom Experiment wurden verschieden viele putativ Insert-positive Kolonien (mindestens jedoch zehn) von den ausplattierten Transformationsansätzen und ü. N. inkubierten Platten gepickt und zum einen zum Animpfen von 30 µl des Kolonie-PCR-Mastermixes und zum anderen zum Ausstreichen auf neuen LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum/Antibiotika versetzt) verwendet. Die sich anschließende Kolonie-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	19,55 µl
10x Puffer C	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPs (je 5 mM)	1,2 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 10 µM	1,5 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 10 µM	1,5 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl; Roboklon)	0,25 µl
Total	30 µl

Tabelle V.3 Auflistung der Komponenten für Kolonie-PCR Analysen.

Die PCR erfolgte im Thermocycler (T3-Cycler, Biometra® , www.biometra.de) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	4 min
2	30-40× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	98 °C	20 sec
3		Annealing	X °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	30-60 sec
5	1×	finale Elongation	72 °C	1 min

Tabelle V.4 Reaktionsschritte für die Kolonie-PCR Analysen. Die Anlagerungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern entsprechend verändert. Zudem war die Dauer der Elongationsphase an die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes angepasst.

Die Kolonie-PCR erfolgte entweder mit Vektor- oder *Insert* (inserteries Zielfragment)-spezifischen Primern. Nach Abschluss der PCR wurden je 10 µl der PCR-Ansätze auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen und dokumentiert. Von den Kolonien, für die das erwartete PCR-Fragment amplifiziert wurde, erfolgte nach einer ü. N. (über Nacht)-Inkubation bei 37 °C auf der neu ausgetrichenen LB-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum/Antibiotika versetzt), die Beimpfung von 10 ml LB-Flüssigmedium (mit entsprechendem Antibiotikum/Antibiotika versetzt) mit diesen Kolonien. Die Flüssigkulturen wurden ü. N. bei 37 °C und ca. 150 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Am Tag darauf erfolgte die Präparation der pDNA (V.2.5.5.1).

V.2.5.2.2 T-DNA Insertionstest mittels PCR

Die Überprüfung der T-DNA-Insertionslinien erfolgte mittels PCR an genomischer DNA. Dafür wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis pipettiert:

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	àd 20µl
10x Puffer B (enthält 15 mM MgCl ₂)	2 µl
dNTPs (je 5 mM)	1,0 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 10 µM	1 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 10 µM	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl; Roboklon)	0,5 µl
gDNA (~50 – 300 ng)	X µl
Total	20 µl

Tabelle V.5 Auflistung der Komponenten für PCR-Analysen zur Überprüfung der T-DNA-Insertion.

Die PCR erfolgte im Thermocycler (T3-Cycler, Biometra®) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	94 °C	20 sec
2	30× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	94 °C	20 sec
3		Annealing	X °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	30-60 sec
5	1 ×	finale Elongation	72 °C	2 min

Tabelle V.6 Reaktionsschritte für PCR-Analysen zur Überprüfung der T-DNA-Insertion. Die Anlagerungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern entsprechend verändert. Zudem war die Dauer der Elongationsphase an die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes angepasst.

Nach Abschluss der PCR wurden je 10 µl der PCR-Ansätze auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen und dokumentiert.

V.2.5.2.3 Gradienten-PCR für Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur

Für die Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur für einen Teil, der in der Arbeit verwendeten Primer (insbesondere für die ChIP-Analysen und die Bisulfitsequenzierung) erfolgte eine sog. Gradienten-PCR an genomischer sowie Bisulfit-behandelter DNA (für die DNA-Methylierungsexperimente). Dafür wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	àd 50µl
10x TrueStart-PCR-Puffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
dNTPs (je 2 mM)	5 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 5 µM	2 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 5 µM	2 µl
TrueStart HS <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl; Fermentas)	0,15 µl
Template-DNA (gDNA oder BS-behandelte DNA)	4 - 5 µl
Total	50 µl

Tabelle V.7 Auflistung der Komponenten für Gradienten-PCR-Analysen.

Die PCR erfolgte im iCycler MyiQ2 (BioRad; www.bio-rad.com) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	2 min
2	35× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	95 °C	45 sec
3		<i>Annealing</i>	45 – 59 °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	30-60 sec
5	1×	finale Elongation	72 °C	7 min

Tabelle V.8 Reaktionsschritte für Gradienten-PCR-Analysen. Die Dauer der Elongationsphase wurde die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes angepasst.

Nach Abschluss der PCR wurden je 25 µl der PCR-Ansätze auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen und dokumentiert und die optimale *Annealing*-Temperatur anhand der Bandenintensität der amplifizierten PCR-Fragmente definiert.

V.2.5.2.4 Sondenmarkierungs-PCR

Für die *Northern-Blot*- (s. Kapitel V.2.5.6.1) sowie die FiSH-Analysen (s. Kapitel V.2.5.11.3) wurden über PCR Digoxigenin (Dig)-markierte Sonden wie folgt hergestellt:

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	àd 40µl
10x PCR-Puffer B (enthält 15 mM MgCl ₂)	4 µl
10x Dig DNA Labeling Mix (1 mM dATP; 1 mM dGTP; 1 mM dCTP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM Dig-11-dUTP)	2 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 5 µM	4 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 5 µM	4 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl; Roboklon)	0,5 µl
Template-DNA (pDNA; 10 - 300 ng)	X µl
Total	50 µl

Tabelle V.9 Auflistung der Komponenten für die Digoxigenin-Markierungs-PCR.

Die PCR erfolgte im Thermocycler (T3-Cycler, Biometra®) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	1 min
2	35× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	94 °C	30 sec
3		<i>Annealing</i>	X °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	1 min
5	1×	finale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle V.10 Reaktionsschritte für die Digoxigenin-Markierungs-PCR. Die *Annealing*-Temperatur wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern modifiziert.

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Ansätze auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen und dokumentiert. Die entsprechenden PCR-Fragmente wurden ausgeschnitten und über das "QIAquick Gel Extraction Kit 250" der Firma QIAGEN gereinigt (s. Kapitel V.2.5.9).

V.2.5.2.5 Bisulfit-Reamplifikations-PCR

Für die Reamplifikation von Zielfragmenten an Bisulfit-behandelter DNA wurden zwei verschiedene Ansätze angewendet:

1. Reamplifikation mittels TrueStart HS Taq DNA Polymerase (Fermentas):

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	28,75 µl
10x TrueStart-PCR-Puffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
dNTPs (je 5 mM)	2 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 5 µM	2 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 5 µM	2 µl
TrueStart HS Taq Polymerase (5 U/µl; Fermentas)	0,25 µl
Template-DNA (gDNA oder BS-behandelte DNA)	5 µl
Total	50 µl

Tabelle V.11 Auflistung der Komponenten für die Reamplifikations-PCR mittels TrueStart HS Taq DNA Polymerase.

Die PCR erfolgte im Thermocycler (T3-Cycler, Biometra®) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	3 min
2	35-40× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	95 °C	30 sec
3		<i>Annealing</i>	X °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	30-60 sec
5	1×	finale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle V.12 Reaktionsschritte für die Reamplifikations-PCR mittels TrueStart HS Taq DNA Polymerase. Die *Annealing*-Temperatur wurde über Gradienten-PCR (s. Kapitel V.2.5.2.3) bestimmt und wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern modifiziert. Zudem wurden die Dauer der Elongationsphase sowie die Zyklenzahl für jedes Fragment angepasst.

2. Reamplifikation mittels KAPAHiFi Uracil+ Polymerase (PEQLAB Biotechnologie GmbH):

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	17 µl
2x Kappa ready mix	25 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 10 µM	2 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 10 µM	2 µl
BS-behandelte DNA	4 µl
Total	50 µl

Tabelle V.13 Auflistung der Komponenten für die Reamplifikations-PCR mittels KAPAHiFi Uracil+ Polymerase.

Die PCR erfolgte unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	4 min
2	30-35× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	98 °C	20 sec
3		<i>Annealing</i>	X °C	30 sec
4		Elongation	72 °C	30-60sec
5	1×	finale Elongation	72 °C	1 min

Tabelle V.14 Reaktionsschritte für die Reamplifikations-PCR mittels KAPAHiFi Uracil+ Polymerase. Die *Annealing*-Temperatur wurde über Gradienten-PCR (s. Kapitel V.2.5.2.3) bestimmt und in Abhängigkeit von den verwendeten Primern modifiziert. Zudem wurden die Dauer der Elongationsphase sowie die Zyklenzahl für jedes Fragment angepasst.

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Ansätze auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen, dokumentiert, die entsprechenden PCR-Fragmente ausgeschnitten und über das "QIAquick Gel Extraction Kit 250" der Firma QIAGEN aufgereinigt (s. Kapitel V.2.5.9).

V.2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation in *E. coli*

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden mittels TAE-Agarose Gelelektrophorese nach ihrer Molekülgröße getrennt und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert (s. Kapitel

V.2.5.9). In Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Polymerase wurden die erzeugten PCR-Produkte entweder unter Verwendung des pGEM[®]-T Vector Systems I (Promega GmbH) oder des CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) in den entsprechenden Vektor nach Vorschrift der Hersteller ligiert. Die Ligationsansätze wurden im Anschluss entweder komplett oder in Teilen in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (RbCl₂-kompetente Zellen, s. Kapitel V.2.5.4) transformiert. Für die Transformation wurde der jeweilige Ligationsansatz direkt auf die gefrorenen kompetenten Zellen gegeben, für 20 min auf Eis inkubiert und nachfolgend für 1 min einem Hitzeschock bei 41 °C im Wasserbad ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort für 2 min auf Eis gekühlt, 850 µl vorgewärmtes LB-Flüssigmedium zugesetzt, für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, anschließend auf Platten mit geeignetem LB-Selektivmedium ausplattiert und für ~16 h bei 37 °C inkubiert. Die putativen positiven Kolonien wurden per Kolonie-PCR unter Verwendung Vektor- oder *Insert*-spezifischer Primer auf die Anwesenheit der entsprechenden DNA-Fragmente überprüft.

V.2.5.4 Herstellung von RbCl₂-kompetenten Zellen:

Zunächst wurden Flüssigkulturen mit Zellen, der in der Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme (s. Kapitel V.1.6) mit jeweils 10 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, falls notwendig) angeimpft und ü. N. bei 37 °C und ca. 160 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml, der Über-Nacht-Kultur (ÜNK) mit 95 ml vorgewärmten LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, falls notwendig) versetzt und bei ca. 150 rpm und 37 °C im Thermoschüttler inkubiert, bis eine OD (optische Dichte) von ca. 0,8 erreicht war. Die Bestimmung der OD erfolgte mittels HP 8452A Diode Array Spektrophotometer (Agilent Technologies Inc) bei einer Wellenlänge von 590 nm. Danach wurde die Bakterienkultur für 5 min bei 4000 * g und 4 °C pelletiert. Nachdem der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet in 40 ml (0,4 * Vol. ausgehend von 100 ml ÜNK) sterilem eiskaltem TfbI-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure einstellen) resuspendiert wurde, erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 10 min im Eisbad. Danach schloss sich erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 * g und 4 °C an. Der Überstand wurde erneut weitgehend dekantiert und das Pellet in 40 ml (0,4 * Vol. ausgehend von 100 ml ÜNK) sterilem eiskaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH auf 6,5 mit KOH einstellen) resuspendiert, für 20 min im Eisbad inkubiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert (je 150 µl / Tube) und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bis zum Gebrauch bei -80 °C.

V.2.5.5 DNA Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse fand die Methode nach Sanger et al. (1977) Anwendung. Für die Sequenzier-PCR wurden ~300 ng gereinigte Plasmid-DNA-Lösung (V.2.5.5.1), 1 µl des entsprechenden Primers (5 µM; in Abhängigkeit vom verwendeten Vektorsystem), 2 µl BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 Mix (Applied Biosystems; jetzt Life Technologies zugehörig), 2 µl 5x BigDye Sequencing Puffer v1.1 zugegeben und mit reinst Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte unter nachstehenden Bedingungen: 94 °C für 10 sec, 35x (94 °C für 10 sec, 55°C-60 °C (je nach Primer) für 5 sec, 60 °C für 4 min). Nach der Reaktion wurde die DNA mit 10 µl reist Wasser sowie 1/10 Vol. 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 3 Vol. 96 %igem Ethanol für 5 min präzipitiert, bei 13000 x g für 20 min pelletiert, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit einem ABI377 Sequenzierer (Applied Biosystems; jetzt Life Technologies zugehörig) mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Dr. Reuter und AG Prof. Dr. Bonas (jeweils MLU Halle-Wittenberg).

V.2.5.6 Isolation von Nukleinsäuren

V.2.5.6.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation der Plasmide aus *E. coli* sind die *Kit's* QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) und Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two (STRATEC Biomedical AG; www.stratec.com) verwendet worden.

V.2.5.6.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Sowohl für die Überprüfung der Nachkommen der *svh2*-GK T-DNA-Insertionslinie auf Homozygotie als auch für die DNA-Methylierungsexperimente über Bisulfitsequenzierung wurde genomische DNA (gDNA) aus den zu untersuchenden Pflanzen isoliert.

V.2.5.6.2.1 gDNA-Extraktion für die Überprüfung der T-DNA-Insertion

(Verändert nach: Rogers and Bendich's CTAB based protocol; Plant Mol. Biol. Manual, A6:1-10, 1988) Hierfür wurde je ein Blatt unter flüssigem Stickstoff mit einem vorgekühltem Pistill fein zerrieben, in 250µl Extraktionspuffer [2% (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 % (w/v) PVP (MW = 40000 g mol⁻¹)] und kräftigem Mischen homogenisiert und für 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde mit 250 µl CI-Lösung (96 % Chloroform, 4 % Isoamylalkohol) versetzt, kräftig gemischt und für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 3 Vol. reinst Ethanol zum Überstand erfolgte die Präzipitation der DNA, die im Anschluss durch Zentrifugieren bei 13000 x g und 4 °C für 20 min pelletiert wurde.

Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in sterilem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

V.2.5.6.2.2 gDNA-Extraktion für DNA-Methylierungsexperimente über Bisulfitsequenzierung

Für die DNA-Methylierungsexperimente über Bisulfit-Behandlung, wurde die gDNA aus je ca. 60 mg Blattmaterial von reifen (NS) und seneszenten (S1) Blättern (Blatt 5-8) des WT's und der *SUVH2-oe* Linie unter Verwendung des Invisorb® Spin Plant Mini Kits (STRATEC Biomedical AG) extrahiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (s. Kapitel V.2.5.7.2). Zur Kontrolle der Integrität der gDNA wurden im Anschluss 250 ng jeder isolierten DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

V.2.5.6.3 Isolation von pflanzlicher RNA für die Northern-Blot, qRT-PCR und Transkriptionsfaktorplattformanalysen

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und die Extraktion der RNA erfolgte in Anlehnung an Chomczynski und Mackey (1995) mit 60°C temperiertem Trizol (0,8 M Guanidiumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat (pH5), 5 % (v/v) Glycerol (99,8 %), 38 % (v/v) Phenol, TE gesättigt, pH 5). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (NanoDrop Spektrophotometer, ND-100 (PEQLAB Biotechnologie GMBH/Thermo Scientific) bestimmt.

V.2.5.6.3.1 Isolierung von poly(A)⁺-RNA

Die Aufreinigung der Poly(A)⁺-RNA erfolgte aus je 800 µg bis 1 mg Gesamt-RNA unter Verwendung des PolyATtract® mRNA Isolation System III-Kits (Promega GmbH) nach Vorschrift des Herstellers. Die extrahierte mRNA wurde auf Eis gelagert und sofort für die weiteren Analysen weiter verwendet.

V.2.5.7 Expressionsstudien

V.2.5.7.1 Genexpressionsanalysen mittels Northern Technik

Nach Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA bzw. poly(A)⁺-RNA erfolgte die Fällung von 15 µg RNA bzw. 3,4 µg poly(A)-mRNA durch 1/10 Vol. 4 M NaCl und 2 Vol. reinst Ethanol ü. N bei -20 °C. Am nächsten Tag wurde die gefällte RNA durch Zentrifugieren bei 13000 x g und 4 °C für 25 min pelletiert, das Pellet mit 150 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNA-Probenpuffer (1x MOPS-Puffer, 50 % deionisiertes Formamid, 6 % Formaldehyd, 10 % Glycerin und 0,008 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die Lösung wurde dann für 10 min bei 65 °C denaturiert und im Anschluss bis zur Gelelektrophorese auf Eis gelagert.

Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der Gesamt-RNA sind denaturierende Agarose-Formaldehyd-Gele verwendet worden. Die Gele enthielten 1 % (w/v) Agarose, 4 % Formaldehyd und 1/10 Vol. 10x MOPS-Puffer (400 mM MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM Na-ETDA, pH 7,2 mit NaOH einstellen) und reinst Wasser. 1x MOPS-Puffer wurde als Laufpuffer verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 85 V für ca. 3 h. Nach dem Ende der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele für 30 min in Wasser gewaschen, 30 min mit 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9,0), der 0,1µg/ml Ethidiumbromid enthielt, gefärbt und zweimal 20 min mit 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) entfärbt.

Northern-Blot: Transfer der RNA

Zur Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Transkripte erfolgte, nach der elektrophoretischen Trennung der RNA-Proben in denaturierenden Agarosegelen, der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche). Bei dem angewandten Drucktransferverfahren (PosiBlot® 30-30 Pressure Blotter and Pressure Control Station, Stratagene Cloning Systems) diente 10x SSC (pH 7,0) als Transferpuffer. Der Transfer erfolgte für etwa 1 h bei einem Druck von ca. 60 mmHg. Im Anschluss an den RNA-Transfer wurde die RNA auf der Membran durch beidseitige Bestrahlung mit UV-Licht in einem UV-Illuminator ("Crosslinker", Stratagene) fixiert.

Hybridisierung

Nachdem die RNA fest an die Membran gebunden vorlag, wurde diese in ein Borosilikat-Hybridisierungsröhrchen (Whatman-Biometra®) überführt und nach Zugabe von etwa 20 ml (High-SDS-Hybridisierungspuffer (High-SDS-Puffer: (7 % (w/v) SDS, 50 % deionisiertes Formamid, 5x SSC-Puffer, 5 % Natriumphosphat-Puffer (1 M Na₂HPO₄, pH 7,0 mit Phosphorsäure einstellen), 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin und 2 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche) äquilibriert und anschließend mit der entsprechenden Sondenlösung (DIG-11dUracil markierte *SUVH2* cDNA in High-SDS-Puffer) für 16h ebenfalls im Hybridisationsofen bei 50 °C inkubiert. Zur Denaturierung der Sonde musste die Hybridisierungslösung vor ihrer Verwendung für mindestens 10 min bei 68 °C erhitzt und anschließend sofort für exakt 2 min im -20 °C Salz-Eisbad abgekühlt werden.

Detektion spezifischer RNAs

Nach der Hybridisierung der Sonde wurde die Membran unter leichtem Schwenken zweimal für 15 min in 2x SSC-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS, zweimal für 15 min bei 50 °C mit vorgewärmtem 0,5x SSC-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, 3 min in Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 7,5 mit NaOH einstellen) äquilibriert, 45min in Blocklösung (1 % (w/v) Roche Blockreagenz, 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen) und 30 min in Blocklösung mit Anti-DIG-Fab-alkalische-Phosphatase-Konjugaten (Roche) inkubiert, zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen und 2 min in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Anschließend wurde die Membran für 15 min bei 37°C mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD® (Roche) inkubiert, in Sarogold®-Folie (Carl Roth GmbH & Co KG) eingepackt und die Chemilumineszenzsignale mit Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Europe GmbH) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (30 min bis 24 h, in Abhängigkeit von der Signalstärke) detektiert. Der Exposition schloss sich die Entwicklung der belichteten Filme in Entwicklerlösung sowie nachfolgendem kurzen Eintauchen in verdünnter Essigsäure mit anschließender Inkubation in Fixierungslösung (Entwickler und Fixierer: Kodak, Rochester) und Waschen in entionisiertem Wasser an.

Herstellung einer DIG-markierten Sonde für Northern Analysen

Die Markierung spezifischer Nukleotidsequenzen zu sog. Sonden für die Analyse der *SUVH2*-Expression in WT-, *SUVH2*-oe- und *svuh2*-GK-Pflanzen erfolgte durch PCR mithilfe des Digoxigenin-11-dUTP (DIG DNA Labeling Kit; Roche). Die Markierungs-PCR für die Generierung der Sonde erfolgte wie in Kapitel V.2.5.2.5 beschrieben. Als *Template* diente cDNA, die an extrahierter RNA aus *SUVH2*-oe-Pflanzen synthetisiert wurde. Die Generierung der cDNA erfolgte wie unter Kapitel V.2.5.6.2 beschrieben. An dieser cDNA erfolgte eine erste PCR unter Verwendung der *SUVH2*-homologen Primer *SUVH2-N_F1* und *SUVH2-N_R1* (aufgelistet im Appendix unter A.8). Daran schloss sich eine sog. *nested*-PCR mit den Primern *SUVH2-N_F2* und *SUVH2-N_R2* (aufgeführt im Appendix unter A.8) für die Digoxigenin-Markierungs-PCR (s. Kapitel V.2.5.2.5) zur Generierung der 475 bp großen *SUVH2*-Sonde an.

V.2.5.7.2 Analyse der Transkriptgehalte mittels quantitativer *realtime*-RT-PCR (qRT-PCR)DNase-Verdau + Test gDNA-Kontaminationen

Zur Entfernung kontaminierender gDNA wurden die Proben mit DNaseI (10 U/µl; Roche) behandelt. Dazu wurden entsprechend 3,56 µg RNA mit 3 µl Inkubationspuffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, pH 7,9), 0,5 µl RNase-freie DNaseI (10 U/µl), 0,5 µl RNase-Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl); Thermo Scientific) zugesetzt und mit sterilem RNase-freiem Wasser auf 30µl aufgefüllt. Nach 12 minütiger Reaktion bei 37 °C wurde die DNaseI durch die Zugabe von 0,86 µl 280mM EDTA und einem 10 minütigen Hitzeschock bei 75 °C inaktiviert. Nach Abkühlen der RNA-Proben auf 4 °C, erfolgte die Zugabe von 1,2 µl 50 mM MgCl₂. Nachfolgend erfolgte eine qRT-PCR unter Verwendung von Primern (aufgelistet im Appendix unter A.8), die spezifisch für eine Intronsequenz von *ACTIN2* (AT3G18780) sind, um das Vorkommen verbliebener gDNA-Kontaminationen auszuschließen. Der Verdau konnte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

cDNA-Synthese

Die DNaseI-verdauten RNA-Proben wurden durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte unter Verwendung des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Scientific) im T3-Thermocycler (Biometra®). Die Generierung der cDNA erfolgte dabei nach Vorschrift des Herstellers. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden die Proben direkt für die qRT-PCR verwendet bzw. bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

qRT-PCR-Ansätze

Die quantitativen *realtime*-PCR (qRT-PCR) Analysen wurden unter Verwendung Gen-spezifischer Primerpaare (im Appendix unter A.8 aufgeführt) durchgeführt und erfolgten in 96 *Well*-Platten. Zur Quantifizierung wurde der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen™ jetzt Life Technologies zugehörig) verwendet. Für die Untersuchungen der Expression von Genen mittels qRT-PCR wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

Komponente	Volumen je Reaktion
steriles Wasser	àd 20µl
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix	10 µl
Primer1 (<i>forward</i>): 5 µM	1,2 µl
Primer2 (<i>reverse</i>): 5 µM	1,2 µl
Fluorescein (1 µM; passives Referenzfluorophor)	0,2 µl
<i>Template</i> (verschiedene cDNA-Verdünnungen, DNaseI-behandelte RNA oder Wasser [<i>no template</i> Kontrolle])	1-2 µl

Tabelle V.15 Auflistung der Komponenten für qRT-PCR-Analysen.

Die mit dem Mastermix und dem entsprechenden *Templates* beladenen Platten wurden mit einer durchsichtigen PCR-Film-Folie (Eppendorf AG, Hamburg, www.eppendorf.com) versiegelt und für 4 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Die PCR erfolgte im iCycler MyiQ2 (BioRad) unter nachstehenden Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
1	1×	Initialbehandlung	50 °C	2 min
2	40× (von Schritt 2 - 4)	Denaturierung	95 °C	15 sec
3		Annealing	X °C	15 sec
4		Elongation	60 °C	15 sec
5		Denaturierung	95 °C	1 min
6	80×	Schmelzkurve	55-95 °C	10 sec

Tabelle V.16 Reaktionsschritte für qRT-PCR-Analysen. Die *Annealing*-Temperaturen wurden in Abhängigkeit von den verwendeten Primern modifiziert.

Im Anschluss an die für die Quantifizierung der Genexpression verwendete PCR, erfolgte die Bestimmung der Schmelzkurven aller innerhalb der PCR entstandenen PCR-Produkte. So konnte dokumentiert werden, ob es sich bei den gebildeten PCR-Produkten um spezifische Produkte handelt (PCR-Produkte mit identischer Schmelztemperatur). PCR-Artefakte lassen sich aufgrund ihrer abweichenden Längen und der daraus resultierenden veränderten Schmelztemperaturen von dem spezifischen Produkt unterscheiden (Czechowski et al. 2004). Die qPCR-Messungen erfolgten für mindestens drei biologische und je zwei technische Replikate (die gemittelt wurden). Die Primersequenzen der untersuchten Referenzgene sind im Appendix unter A.8 aufgeführt. Für jedes Primerpaar erfolgte in Voruntersuchungen eine Test-qRT-PCR-Analyse bei der eine Verdünnungsreihe (vier Verdünnungsstufen; Faktor 2, 4 oder 8) der zu untersuchenden cDNAs generiert wurde, um zum einen die PCR-Effizienz und somit die Qualität der Amplifikation zu bewerten. Zum anderen wurde so bestimmt, welche cDNA-Verdünnungsstufe am geeignetsten für die eigentlichen Expressionsanalysen, die nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Czechowski et al. 2004) berechnet wurden, ist. Dabei galten, sofern möglich, CT-Werte (*crossing threshold*) zwischen 20 und 30 als gute Standardwerte für die Quantifizierung von Expressionsdaten. Für die ausgewählte cDNA-Verdünnung erfolgte im Anschluss die Bestimmung der Transkriptgehalte in den zu untersuchenden Entwicklungsstadien relativ zur Kontrolle. Dabei wurden für jedes untersuchte Entwicklungsstadium Doppelproben analysiert. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der *Bio-Rad iQ5* Software Version 2.1.94.617 (Bio-Rad).

Berechnung ddct quantifizierende realtime RT-PCR (qRT-PCR)

Nach Abschluss der qRT-PCR und der Analyse der Schmelzkurven, erfolgte die Datenauswertung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Czechowski et al. 2004). Dabei basiert die Berechnung der relativen Transkriptgehalte auf den sog. CT-Werten (*crossing threshold* oder *cycles to threshold*). Diese CT-Werte sind relative Werte, die die Zyklenanzahl der PCR angeben, bei der die gemessene Fluoreszenz und somit die Menge der amplifizierten DNA einen bestimmten Wert erreicht, der sich deutlich von der Grundfluoreszenz absetzt (*threshold*). Die Expressionsdaten für jedes Zielgen werden auf die CT-Werte eines Referenzgens normalisiert. Daraus resultieren die sog. ΔCT -Werte, auf die alle nachfolgenden Berechnungen aufbauen ($\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$). Dazu erfolgte in Vorversuchen die Analyse der Expression in den zu untersuchenden Entwicklungsstadien eines Sets von Genen [*18S* rRNA (AT2G01010), *ACTIN2* (AT3G18780), *UBQ10* (AT4G05320) und *GAPDH* (AT1G13440)], die häufig in anderen qRT-PCR-Analysen als konstitutiv exprimierte Gene zur Datennormalisierung verwendet werden (Czechowski et al. 2005). Für die komplette Seneszenzkinetik (NS, S0, S1, S2 und S3-Stadium) konnte einzig für die *18S* rRNA eine vollständig stabile Expression auch für die späten Seneszenzstadien festgestellt werden. Daher erfolgte die Normalisierung auf die Expression der *18S* rRNA. Für die Analysen der TF-Plattformdaten (s. Kapitel V.2.5.7.3), in denen das NS-Stadium und das S1-Stadium untersucht wurden, erfolgte die Normalisierung auf *ACTIN2* (s. Kapitel V.2.5.7.3). Anhand der normalisierten CT-Werte, der zu vergleichenden Bedingungen (z.B. Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien), konnten die relativen Veränderungen der Expression (= *Fold Change* (FC) = Veränderungen des relativen Transkriptgehaltes) wie folgt berechnet werden: $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, wobei sich $\Delta\Delta\text{CT}$ wie folgt ergibt: $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Seneszenzstadium}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrollstadium}}$ bzw. $\Delta\text{CT}_{\text{SUVH2-oe (Stadium X)}} - \Delta\text{CT}_{\text{WT (Stadium X)}}$.

Für *SUVH8* konnte in allen Replikaten keine Expression im Kontrollstadium detektiert werden (keine Amplifikation innerhalb der 40 PCR-Zyklen). In diesem Fall war es demnach nicht möglich, den FC zu berechnen bzw. die relativen Transkriptgehalte in den Seneszenzstadien zu ermitteln. In diesem Fall wurden die Expressionsdaten im NS-Stadium 40 (= max. Zyklenanzahl) gesetzt und die relativen Veränderungen während der Seneszenzkinetik nach der (40- ΔCT)-Variante dargestellt.

V.2.5.7.3 Genexpressionsstudien der Transkriptionsfaktorplattform mittels qRT-PCR

Für die Expressionsanalysen der 1870 regulatorischen Faktoren der Transkriptionsfaktorplattform (TF-Plattform) wurden zwei Entwicklungsstadien für WT- und *SUVH2*-oe-Pflanzen untersucht. So erfolgte der Vergleich der Expressionsdaten, die für das mittlere Seneszenzstadium S1 erhalten wurden, mit denen des nicht seneszenten Kontrollstadiums NS. Dazu wurde die RNA aus drei verschiedenen biologischen Replikaten wie unter Kapitel

V.2.5.6.3 beschrieben, extrahiert und mit der RNase-freien DNase (2 U/ μ l) des TURBO DNA-free™ Kits (Ambion, jetzt zugehörig zu Life Technologies) nach Vorschrift des Herstellers behandelt, um gDNA-Kontaminationen zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der Vollständigkeit des Verdaus der gDNA durch qRT-PCR unter Verwendung von Intron-spezifischen Primern des Kontrollgens *AT5G65080* (Primersequenzen sind im Appendix unter A.8 aufgelistet). Die Generierung der cDNA erfolgte wie unter Kapitel V.2.5.7.2 beschrieben. Nachfolgend wurde die Qualität der cDNA durch Expressionsanalysen ausgewählter Referenzgene [*ACTIN2* (AT3G18780), *UBQ10* (AT4G05320) und *GAPDH* (AT1G13440)] durch spezifische Primer (Primersequenzen im Appendix unter A.8 aufgelistet) untersucht. Die qRT-PCR-Versuche erfolgten unter Verwendung einer neueren Version der Arabidopsis TF-Plattform von Czechowski et al. (2004) im ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems; jetzt Life Technologies zugehörig) wie in Caldana et al. (2007) beschrieben. Die verwendeten Primersequenzen sind aus Platzgründen nicht in dieser Arbeit aufgeführt, können aber in Ay et al. (2014b) im *Supplemental DS 5a* nachgelesen werden. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der SDS 2.3 Software (Applied Biosystems; jetzt Life Technologies zugehörig). Die Qualität der qRT-PCR-Amplifikationsdaten wurden mit dem LinRegPCR Programm (Version 2013.0; Ramakers et al. 2003) untersucht. Die Expressionsdaten eines jeden Gens wurden auf die CT-Werte des ausgewählten Referenzgens *ACTIN2* normalisiert. Die nachfolgenden Berechnungen wurden basierend auf den resultierenden Δ CT-Werten = $CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{ACT2}}$ durchgeführt. Um die \log_2 Veränderungen der Transkriptgehalte zu berechnen, wurden die Δ CT-Werte der zu vergleichenden Proben voneinander subtrahiert und ergaben so $\Delta\Delta$ CT (Δ CT_{S1} - Δ CT_{NS} bzw. Δ CT_{SUVH2-oe (Stadium X)} - \DeltaCT_{WT (Stadium X)}). Die relativen Transkriptgehalte (relative Veränderung = *Fold Change*) ergaben sich dann durch $2^{-\Delta\Delta$ CT}.}}

V.2.5.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

V.2.5.8.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde nach Bestimmung der Extinktion bei 260nm (NanoDrop Spektrophotometer, ND-100, PEQLAB Biotechnologie GmbH / Thermo Scientific) nach folgender Formel berechnet: RNA-Konzentration = c RNA [ng/ μ l] = $E_{260} \times 40$. (E = Extinktion)

V.2.5.8.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde nach Bestimmung der Extinktion bei 260nm (NanoDrop Spektrophotometer, ND-100, PEQLAB Biotechnologie GmbH / Thermo Scientific) nach folgender Formel berechnet: DNA-Konzentration = c DNA [ng/ μ l] = $E_{260} \times 50$. (E = Extinktion)

V.2.5.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur größenabhängigen Trennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten diente die horizontale Agarosegelelektrophorese. Die Gele wurden mit 1 bis 2 % (w/v) Agarose (zur DNA/RNA Elektrophorese; Roth oder Qiagen) in 1x TAE-Puffer (pH 8,0) gegossen. Die DNA- und RNA-Proben wurden mit entsprechendem Volumen 6x DNA- bzw. RNA-Proben-Ladepuffer vermischt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (pH 8) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in EtBr₂ (1 μ g ml⁻¹) für 20 min gefärbt und falls notwendig 1-2-mal in sterilem deionisiertem Wasser für 10 bis 20 min entfärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

V.2.5.10 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung der Fragmente wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten und über das QIAquick Gel Extraction Kit 250 der Firma QIAGEN gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

V.2.5.11 Immunozytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern

Die Fluoreszenzsignale wurden jeweils mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop und den entsprechenden Anregungsfiltern über eine gekühlte CCD Kamera (PHOTOMETRIX; www.photometrics.com) aufgenommen. Die einzelnen Bilddateien wurden separat mit der SPOT 4.6 Software (Diagnostic Instruments; www.spotimaging.com) und der Photoshop Software (ADOBE SYSTEMS; www.adobe.com) bearbeitet.

V.2.5.11.1 Nachweis von Histonmodifikationen

Für den immunozytologischen Nachweis von Histonmodifikationen wurden Rosettenblätter (Blatt 5 und 6) von Arabidopsispflanzen des WTs und der *SUVH2-oe*-Linie für die definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 untersucht. Je ein Blattstück wurde auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger in 50 μ l Fixierungslösung gelegt (4 % Formaldehyd in 1x PBS) und mit Hilfe einer Rasierklinge fein zerkleinert. Die Suspension wurde mit einem Deckglas abgedeckt, etwa 10 min bei RT inkubiert und dann kurz gequetscht. Im Anschluss wurden die Präparate in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Deckglas wurde anschließend mittels einer Rasierklinge zügig abgehoben und das Präparat nachfolgend dreimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Nach einer Präinkubation der Präparate in BSA (*Bovine Serum Albumin*; Rinderserumalbumin)-Lösung (1-3 % BSA in 1x PBS) für 30 min bei 37 °C, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (1:100 in 1x PBS-Puffer verdünnt) für 1 h bei 37 °C oder ü. N. bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die

Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in 1x PBS, verdünnt; Ziege-anti-Kaninchen, Alexa 488 konjugiert, MOBITEC, Göttingen) für 1 h bei 37 °C oder ü. N. bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 5 min wurde die DNA mit DAPI (0,2 µg/ml DAPI in McIlvaine Puffer [0,01 M Citronensäure; 0,02 M Na₂HPO₄, pH 7; 25 % Glycerol]) gegengefärbt. Für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie erfolgten jeweils vier biologische Replikate für jeden Antikörper und jedes Entwicklungsstadium. Für jedes biologische Replikat wurden mindestens 20 Kerne eines Präparates dokumentiert. Folgende primäre Antikörper wurden in den Analysen verwendet: H3K4 anti-dimethyl und H3K4 anti-trimethyl (07-030, 07-473; Upstate Biotechnology, jetzt Merck Millipore zugehörig; www.millipore.com); H3K9 anti-dimethyl (ab1220; Abcam, www.abcam.com); H3K27 anti-trimethyl (07-449; Upstate Biotechnology, jetzt Merck Millipore zugehörig).

V.2.5.11.2 Immunozytologischer Nachweis des SUVH2-Proteins

Für die immunozytologischen Analysen zum Nachweis des SUVH2-Proteins im Zellkern, wurden junge Rosettenblätter des Arabidopsis WT, der *suvh2*-GK und der *SUVH2*-oe-Linie verwendet. Die Rosettenblätter von Arabidopsis wurden analog zum Nachweis von Histonmodifikationen (s. Kapitel V.2.5.11.2) fixiert und in BSA-Lösung (3% BSA in 1x PBS) für 30 min präinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37°C bzw. ü. N. bei 4 °C mit dem polyklonalem SUVH2-Antikörper (α -SUVH2; 1:50 verdünnt in 1x PBS-Lösung). Für die Immunodetektion des SUVH2-Proteins wurde ein Anti-SUVH2 Antiserum in Hasen gegen die SUVH2-Peptide 2-154 generiert und das SUVH2 IgG aus diesem Serum durch die Firma pab productions (Herbertshausen, Deutschland) aufgereinigt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in 1x PBS, Ziege-anti-Kaninchen, Alexa 488 konjugiert, MOBITEC, Göttingen) für 1 h bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 5 min wurde die DNA mit DAPI gegengefärbt.

V.2.5.11.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung-Analysen (FiSH)

Für die FiSH-Analysen wurden Rosettenblätter (Blatt 5 und 6) des Arabidopsis WT und der *SUVH2*-oe-Linie der definierten Entwicklungsstadien NS, S0, S1, S2 und S3 (s. Kapitel V.2.4) verwendet. Von den geernteten Blättern wurden Blattstückchen in eiskalter Fixierungslösung (Methanol/Essigsäure 3:1) für ~1 h auf Eis inkubiert (dreimaliger Wechsel der Lösung aller 20 min) und anschließend nach Entfernen der Lösung einmal mit sterilem Wasser für 5 min sowie zweimal für 10 min in Citronensäure-Natriumcitratpuffer (0,01 M Citronensäuremonohydrat; 0,01 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat, pH 4,8) gewaschen. Die Proben wurden in 100 µl Cellulasepuffer (jeweils 0,3% Cellulase Onozuka R-10 (Merck Eurolab GmbH) / Macerace™ (Calbiochem) in Citronensäure-Natriumcitratpuffer) für 60 - 120 min bei 37 °C in einer „feuchten Kammer“ verdaut, zweimal für 10 min in Citronensäure-Natriumcitratpuffer gewaschen und anschließend mit einer Pipette in 50 - 100 µl Citronensäure-Natriumcitratpuffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger getropft, verteilt, mit 1 - 3 Tropfen 45 %iger Essigsäure vermischt und mit einem Deckglas abgedeckt. Im Anschluss wurde die Probe gequetscht und durch Übersichten mit Trockeneis für 3 min eingefroren. Nach dem zügigen Abheben des Deckglases mit einer Rasierklinge, wurde das Präparat bei 60 °C für 30 min auf einer Heizplatte erhitzt. Anschließend wurde der Objektträger zweimal für je 5 min in 2x SSC-Puffer (0,3 M Natriumcitrat-Puffer pH 7,4; 0,3 M NaCl) gewaschen und dann für 45 min mit RNase A-Lösung (100 µg/ml RNase A in 2x SSC-Puffer) bei 37°C oder ü. N. bei 4°C in einer „feuchten Kammer“ inkubiert. Nach dem Verdau wurde das Präparat für 5 min in 2x SSC-Puffer gewaschen, mit einem Tropfen Paraformaldehydlösung (1 % (v/v) PFA in 2x SSC-Puffer) für 10 min bei RT inkubiert, erneut für 5 min in 2x SSC-Puffer gewaschen, in einer Ethanolreihe dehydriert (70 %, 90 % und 100 % für jeweils 2 min) und dann luftgetrocknet. Das Präparat wurde dann in 25 - 30 µl Denaturierungslösung I (70% Formamid; 2x SSC; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7) für 2 min bei 75 °C inkubiert, in einer eiskalten Ethanolreihe dehydriert (70 %, 90 % und 100 % für jeweils 2 min) und anschließend luftgetrocknet. Nachfolgend wurde das Präparat mit ~30 µl Hybridisierungsmix (100 ng DIG-markierte DNA-Sonde in: 50 % Formamid; 2x SSC; 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 10 % Dextransulfat, 5 µg Lachsspermien-DNA) versetzt und für 18 h bei 37°C in einer „feuchten Kammer“ inkubiert. Im Anschluss an die Sondenhybridisierung erfolgte die Inkubation des Präparates in 25 - 30 µl Denaturierungslösung II (50 % Formamid / 2x SSC pH 7) für 15 min bei 42 °C. Nach zweimaligen Waschen für je 5 min mit 2x SSC-Puffer, wurde das Präparat für die immunozytochemische Detektion für 30 min bei 37 °C in 4x SSC mit 5% Milchpulver (4M-Puffer) präinkubiert und anschließend der primäre Antikörper gegen Digoxigenin (1:25 in 4M-Puffer, anti-Maus; Roche: 11333062910) zugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen für 15 min in 2x SSC-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 Anti-Dig-Fluoresceinisothiocyanat (FITC fab Fragmente) in 4M-Puffer, Kaninchen-anti-Schaf, Acris Antibodies; www.acris-antikoerper.de) für 1 h bei 37°C. Nach erneutem Waschen für 15 min in 2x SSC-Puffer wurde die DNA mit DAPI gegengefärbt. Die FiSH-Analysen erfolgten jeweils für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie in vier biologischen Replikaten für jedes Entwicklungsstadium. Für jedes Replikat wurden mindestens 20 Kerne eines Präparates dokumentiert.

V.2.5.12 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden für FiSH

Für die FiSH-Analysen wurde eine Digoxigenin (Dig) markierte 180 bp-Repeat-Sonde hergestellt. Dazu wurde ein 180 bp-Repeat-Fragment aus genomischer DNA mittels PCR unter Verwendung der im Appendix unter A.8 aufgelisteten Primer (180bp_F und 180bp_R) amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-T (Promega GmbH) kloniert. Die Markierung der 180bp-Repeat-DNA erfolgte im Anschluss in einer nachfolgenden PCR (s. Kapitel V.2.5.2.5) unter Verwendung des DIG DNA Labeling Mixes (Roche). Etwa 100 ng des Dig-markierten PCR-

Produktes wurden zu 30µl Hybridisierungslösung (50 % Formamid; 2x SSC; 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 10 % Dextransulfat; 5 µg Lachsspermien-DNA) zugegeben, dann für 5 min aufgekocht und im Anschluss auf Eis bis zur Verwendung abgekühlt.

V.2.5.13 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Analysen erfolgten an Blattmaterial (Blatt 5-8), dass zu den physiologisch definierten Entwicklungsstadien NS und S1 für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie geerntet wurde. Die Immunopräzipitationen (IPs) erfolgten dabei unter Verwendung von *ChIP grade* Antikörpern gegen die posttranslationalen Histonmodifikationen H3K4me2 (Dimethylierung von Lys4 and H3), H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3 sowie eines Antikörper gegen den nicht modifizierten C-terminalen Teil von H3 (H3C; ab1791; Abcam). Die verwendeten Antikörper gegen die posttranslationalen Modifikationen an H3 waren dieselben, die auch in den immunozytologischen Untersuchungen genutzt wurden (s. Kapitel V.2.5.9.2). Die ChIP-Analysen sowie die Quantifikation der immunopräzipitierten DNA über qPCR-Analysen sind, wie in Ay et al. (2009) beschrieben, durchgeführt worden. Für die Berechnung der Prozent-Input (%-Inputwerte = %I) wurde aus der Input-DNA (DNA, die aus einem definiertem Teil des Chromatins extrahiert wurde, der nicht mit einem Antikörper versetzt war) durch verschiedene Verdünnungen (0,12; 0,06, 0,03; 0,015; 0,0075 und 0,00375%) eine Standardkurve für jedes analysierte Amplikon generiert. Anhand dieser Standardkurve erfolgte die Berechnung der %I der IPs relativ zur Input-DNA für jede Probe. Für die Normalisierung der %I-Werte, die für die drei Ziel-SAG-Markergene *SAG12* (AT5G45890), *ANAC083* (AT5G13180) und *WRKY53* (AT4G23810) erhalten wurden, wurden verschiedene Referenz-DNA-Bereiche (aufgelistet im Appendix in Tabelle A.1) ausgewählt und auf ihre Eignung als Referenzgene untersucht. Im Appendix in Kapitel A.1 und A.3 sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen dieser Referenz-DNA-Bereiche gezeigt. Im Anschluss an diese Voruntersuchungen in dieser Arbeit wurden folgende Bereiche für die Normalisierung der SAG-ChIP-Daten ausgewählt:

Antikörper	Referenz-DNA
H3K4me2	<i>TUA4-II</i> -Region
H3K4me3	<i>TUA4-II</i> -Region
H3K9me2	<i>180bp SR</i>
H3K27me3	<i>SAG12-II</i> -Region

Tabelle V.17 Auflistung der in den ChIP-Analysen verwendeten Antikörper gegen Histonmodifikationen und die zugehörigen Referenz-DNA-Bereiche.

Die %I der SAG-Markergene sowie der Referenz-DNA-Bereiche wurden dazu für das NS und das S1-Stadium jeweils für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie berechnet. Für die IPs der H3K4me2-, H3K4me3- und H3K9me2-Modifikationen erfolgte anschließend die Normalisierung der %I der Zielgene eines Entwicklungsstadiums separat für jedes biologische Replikat auf die entsprechenden %I der ausgewählten Referenz-DNA-Sequenz (Tab. V.15). Dazu wurden die für die Referenz-DNA-Bereiche berechneten %I-Werte eines Entwicklungsstadiums 100% gesetzt. Die für die SAG-Markergene berechneten %I wurden dann auf die %I der entsprechenden Referenz-DNA-Bereiche bezogen. Für die H3K27me3-IPs zeigte sich ein Abfall von H3K27me3 im S1-Stadium an dem ausgewählten Referenz-DNA-Bereich. Daher erfolgte die Normalisierung der H3K27me3-ChIP-Daten beider Entwicklungsstadien für die Zielgene auf die %I-Werte des NS-Stadiums für die *SAG12-II*-Region. Die ChIP-Analysen wurden für jedes SAG in mindestens vier unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Für die Amplifikation aller Gene wurden spezifische Primer designt (Sequenzen sind im Appendix unter A.8 aufgelistet). Zu Beginn der ChIP-Analysen wurden die amplifizierten Endprodukte der qPCR auf 1% (w/v) 1x TAE-Agarosegelen aufgetragen und über Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente wurden dann aus den Gelen ausgeschnitten und über QIAquick Gel Extraction Kit 250 der Firma QIAGEN eluiert (s. Kapitel V.2.5.9), in den pGEM-T-Vektor kloniert (Promega GmbH), in *E. coli* transformiert (s. Kapitel V.2.5.3) und jeweils zehn unabhängige Klone sequenziert (s. Kapitel V.2.5.5), um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu überprüfen.

V.2.5.14 Bisulfitsequenzanalyse

Während der Behandlung von gDNA mit Bisulfit werden nicht methylierte Cytosine in Uracil, das in einer nachgeschalteten Sequenzierungsreaktion als Thymin gelesen wird, konvertiert. Im Gegensatz dazu werden methylierte Cytosine nicht konvertiert, wodurch eine Unterscheidung methylierter und nicht methylierter DNA möglich wird. Die Bisulfitanalysen erfolgten an Blattmaterial (Blatt 5-8), das zu den physiologisch definierten Entwicklungsstadien NS und S1 für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie geerntet wurde. Die Extraktion der gDNA erfolgte wie unter Kapitel V.2.5.6.2.2 beschrieben. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Integrität der gDNA über Gelelektrophorese überprüft. Dazu sind je 250 ng der extrahierten gDNA auf 1x TAE-Agarosegele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt worden. 2 µg intakter gDNA wurden dann mit dem BamHI-Restriktionsenzym (Thermo Scientific) ü. N. (~16 h) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Präzipitation der verdauten DNA mit 1/10 Vol. 3 M C₂H₃NaO₂ sowie 3 Vol. 96 %igem Ethanol nach kräftigem Mischen bei -20°C für mindestens 2 h. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei RT und 13000 x g wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 7 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert, getrocknet (nicht länger als 7 min) und dann das Pellet in 20 µl DNase-freiem sterilen Wasser (ist im

verwendeten Bisulfit-Kit-System vorhanden) gelöst. Die DNA-Lösung wurde dann für mind. 10 min bei 55°C konstant geschüttelt und anschließend sofort bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die eigentliche Bisulfitbehandlung erfolgte unter Verwendung des EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kita (Qiagen) weitestgehend nach Vorschrift des Herstellers. Einzig die Zyklusbedingungen der Bisulfitkonvertierungsreaktionen wurden wie folgt modifiziert: 90 °C, 5 min, 60 °C 25 min, 90 °C 5 min, 60 °C 45 min, 90 °C 5 min, 60 °C 55 min, 90 °C 5 min, 60 °C, 60 min, 90 °C 5 min, 60 °C 60 min. Die Bisulfit-behandelte und aufgereinigte DNA wurde entweder direkt weiter verwendet oder für 24 h bei 4 °C bzw. für längere Zeit bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Im Anschluss erfolgte die Reamplifikation der Zielfragmente mittels PCR wie in Kapitel V.2.5.2.5 beschrieben. Für die Amplifikation wurden degenerierte Primer verwendet. Für alle verwendeten Primer erfolgten in Vorversuchen Gradienten-PCR-Analysen auf gDNA und Bisulfit-behandelter DNA (s. Kapitel V.2.5.2.3), um die optimale *Annealing*-Temperatur für jedes Primerpaar zu bestimmen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Appendix unter A.8 inklusive der ermittelten optimalen *Annealing*-Temperatur aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss auf 1 - 1,5% (w/v) 1x TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, eluiert und in Abhängigkeit von der für die Reamplifikation verwendeten DNA-Polymerase in den pGEM-T-Vektor (Promega GmbH) bzw. den pJET1.2-Vektor (CloneJET Thermo Scientific) kloniert und in *E. coli* transformiert. 15 bis 20 Kolonien wurden über Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des klonierten PCR-Fragmentes überprüft. Von positiven Klonen wurden ÜNK angesetzt und am nächsten Tag die pDNA präpariert. Mindestens fünf unabhängige Klone wurden pro Amplikon, Entwicklungsstadium und Replikat für den WT und die *SUVH2*-oe-Linie sequenziert. Die erhaltenen Sequenzierungsdaten wurden unter Verwendung der *Lasergene 10 Expert Sequence Analysis* Software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) prozessiert (Entfernen von Vektor- und Primersequenzen). Im Anschluss erfolgte ein *multiple sequence alignment* durch den ClustalW Algorithmus mit der *BioEdit v7.2.5* Software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Um die DNA-Methylierungsmuster zu berechnen und zu illustrieren, erfolgte die Analyse der *multiple sequence alignments* unter Verwendung des *CyMATE* Programmes [<http://www.gmi.oeaw.ac.at/en/cymate-index>; Hetzl et al. (2007)]. Die Bisulfitanalysen erfolgten in zwei unabhängigen biologischen und je zwei technischen Replikaten. Neben den drei Fragmenten *W53-I*, *W53-II* und *W53-III* des kodierenden Stranges von *WRKY53* erfolgte zudem parallel die Analyse der DNA-Methylierungsmuster an DNA-Abschnitten zweier Kontrollgene. So diente einerseits das *ELF5A-3*-Gen (*EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR 5A-3*; AT1G69410), für das in Arabidopsis Keimlingen ein komplettes Fehlen der Methylierung an Cytosinen gezeigt werden konnte (Zhang et al. 2006), zur Überprüfung der Konvertierungseffizienz der Bisulfitbehandlungen. Zum anderen wurde ein Abschnitt des *MULE*-Transposons (AT2G15810), das in Keimlingen eine hohe Dichte von Cytosinmethylierungen in allen drei möglichen Sequenzkontexten aufweist (Zhang et al. 2006), als Positivkontrolle untersucht.

V.2.6 Datenbankenanalysen und Bioinformatik

V.2.6.1 Datenbankanalysen

Für die Datenbanksuche von DNA- und Proteinsequenzen sind die *Nucleotide Blast*, *Protein Blast*, *BlastX*, *TBlastN*, *TBlastX* und *Conserved Domain Search* Programme des *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet worden. Für die Analyse von Genen und den entsprechend kodierten Proteinen aus Arabidopsis ist zudem die TAIR-Datenbank (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org>) genutzt worden. Promotorsequenzanalysen erfolgten anhand der Web-basierenden Anwendungen *Athena* (O'Connor et al. 2005) und *AGRIS* [*Arabidopsis Gene Regulatory Information Server*; <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>; Yilmaz et al. (2011)]. Die genomweiten Daten der H3K4me₂-, H3K4me₃-, H3K9me₂- und H3K27me₃-ChIP-Analysen, die in Arabidopsis-Keimlingen erfolgten, wurden im *UCSC Genome Browser on A. thaliana* (January 2004; *Assembly at UCLA*, <http://epigenomics.mcdb.ucla.edu/>; Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2007; Bernatavichute et al. 2008) abgerufen. Für die Auswertung von DNA-Sequenzierungsdaten sind das *SeqMan* Programm der *Lasergene Expert Sequence Analysis* Software (DNASTAR Inc.) und die bereits erwähnten Internethilfsmittel verwendet worden. Die Vergleiche mehrerer Aminosäuresequenzen sind mit dem ClustalW Algorithmus des MegAlign Programms der *Lasergene expert sequence analysis* Software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt worden. Dabei sind die ClustalW Parameter *Gap Penalty*: 10,00; *Gap Length Penalty*: 0,20; *Delay Divergent Seqs (%)*: 30; *DNA Transition Weight*: 0,50 und *Protein Weight Matrix* = Gonnet Series verwendet worden. Die Vergleiche mehrerer Nukleotidsequenzen erfolgten mit dem ClustalW Algorithmus des *MegAlign* Programms der *Lasergene Expert Sequence Analysis* Software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) sowie mit dem Programm *BioEdit v7.2.5* (*Biological sequence alignment editor for WIN95/98/NT/2K/XP*, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) durchgeführt worden. Die statistischen Analysen der TF-Plattformdaten erfolgten mit dem *MultiExperiment Viewer tool* (MeV 4.8.1) der *TIGR TM4* Software (Saeed et al. 2003; Saeed et al. 2006). Die Expressionsdaten von *SUVH2* in verschiedenen Arabidopsis Entwicklungsstadien wurden unter Verwendung von *Genevestigator* (www.genevestigator.com; Hruz et al. 2008) extrahiert. Des Weiteren erfolgten Datenbankrecherchen anhand der *Plant Transcription Factor Database* der Universität Potsdam (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>; Pérez-Rodríguez et al. 2010). Für die Erstellung von Bilddateien wurden das Programm *Photoshop* (ADOBE SYSTEMS), für Tabellenkalkulationen und Textverarbeitung das *Microsoft Office Paket* (MICROSOFT; www.microsoftstore.com) verwendet.

V.2.6.2 Clusteranalysen der Transkriptionsfaktorplattformdaten

Die Clusteranalysen der 383 als SARFs (*senescence associated regulatory factors*) identifizierten Gene erfolgten auf Basis der Δ CT-Werte des NS- und S1-Stadiums des WT und der *SUVH2*-oe-Linie unter Verwendung des *K-means* Algorithmus (*Pearson* Korrelation). Zuvor erfolgte die Bestimmung der optimalen Clusteranzahl durch den sog. *Figure of Merit* (FOM). Die Analysen wurden mit dem *MultiExperiment Viewer tool* (MeV 4.8.1) der *TIGR TM4* Software (Saeed et al. 2003; Saeed et al. 2006) durchgeführt.

Auswahlkriterien für die Top-Kandidatengene aus Cluster 2 für detaillierte Expressionsanalysen

Die zehn Gene aus Cluster 2 mit der stärksten Suppression im S1-Stadium von *SUVH2*-oe Pflanzen wurden aufgrund nachstehender Kriterien für weiterführende Expressionsanalysen in einer Seneszenzkinetik ausgewählt:

- 1.) der *Fold Change* (FC) für den WT (WT S1/NS) sollte ≥ 4 sein.
- 2.) der FC für die *SUVH2*-oe-Linie (*SUVH2*-oe S1/NS) sollte < 4 sein.
- 3.) der FC für das NS-Stadium (*SUVH2*-oe NS/WT NS) sollte $\geq 0,5 \leq 2$ sein.
- 4.) der FC für das S1-Stadium (*SUVH2*-oe S1/WT S1) sollte $< 0,5$ sein.
- 5.) der FC für den WT (WT S1/NS) sollte mindestens dreimal höher sein als der FC in *SUVH2*-oe (*SUVH2*-oe S1/NS).

V.2.6.3 Statistische Methoden

V.2.6.3.1 Statistische Analyse der physiologischen Messungen, Expressions- und ChIP-Analysen

Um die statistische Signifikanz der erhaltenen Werte zu ermitteln, wurde der *Student's t*-Test in Abhängigkeit vom Experiment für gepaarte bzw. ungepaarte Daten angewandt. Für die Analyse der physiologischen Daten erfolgte der *t*-Test anhand der Mittelwerte der vier biologischen Replikate. Für die Analyse der qRT-PCR-Daten wurden die Mittelwerte (der technischen Replikate) der Δ CT-Werte aus mindestens drei biologischen Replikaten als Grundlage der Berechnung benutzt, für ChIP-Daten wurde die statistische Relevanz aus den %-Inputwerten (%I) der mindestens vier biologischen Replikate berechnet. Folgende Signifikanzwerte wurden verwendet: *p*-value: $p < 0,05$ (= * bzw. a); $p < 0,01$ (= ** bzw. b); $p < 0,001$ (= *** bzw. c). Die Berechnungen erfolgten in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, www.microsoft.com).

V.2.6.3.2 Statistische Analyse der Transkriptionsfaktorplattformdaten

Die statistische Analyse der erhaltenen Rohdaten wurde durchgeführt wie in Ay et al. (2014b) beschrieben. Dabei erfolgte zunächst eine Überprüfung der Vergleichbarkeit der Daten aus den drei biologischen Replikaten über die Bestimmung eines sog. Konfidenzintervalls (LOC = *level of confidence* = 95%). Alle Gene mit einem LOC < 95 % wurden, aufgrund zu großer Schwankungen zwischen den Replikaten, von den weiteren Analysen ausgeschlossen (aufgelistet in Ay et al. (2014b) im *Supplemental DS 1e*). Für alle anderen Gene erfolgte die statistische Analyse der erhaltenen normalisierten Δ CT-Werte der beiden Entwicklungsstadien für den WT (Δ CT_{S1} - Δ CT_{NS}) und die *SUVH2*-oe-Linie (Δ CT_{S1} - Δ CT_{NS}) sowie zwischen den Stadien selbst (Δ CT_{WT(NS)}} - Δ CT_{SUVH2-oe(NS)}} bzw. Δ CT_{WT(S1)}} - Δ CT_{SUVH2-oe(S1)}}) über einen *t*-Test unter Verwendung des *MultiExperiment Viewer tools* (MeV 4.8.1) der *TIGR TM4* Software (Saeed et al. 2003; Saeed et al. 2006). Der zu erreichende Signifikanzschwellenwert (α) des *t*-Tests wurde vor dessen Durchführung auf 5 % festgelegt ($\alpha = 5\%$), d. h. alle Gene deren korrigierter *p*_c-Wert $< 0,05$ (FDR Ansatz von Benjamini und Hochberg (1995); FDR = *False Discovery Rate*) war, wurden als signifikant unterschiedlich zueinander betrachtet. Als differentiell unterschiedlich im WT bzw. der *SUVH2*-oe-Linie im S1-Stadium bezogen auf das korrespondierende NS-Stadium exprimiert, galten weiterhin solche Gene, die signifikant unterschiedlich und deren relative Veränderung (*Fold Change*) mindestens vierfach ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \geq 4$) bzw. kleiner als 0,25fach ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \leq 0,25$) war. Als differentiell unterschiedlich im NS- bzw. S1-Stadium zwischen dem WT und der *SUVH2*-oe-Linie exprimiert galten weiterhin solche Gene, die signifikant unterschiedlich und deren relative Veränderung (*Fold Change*) mindestens zweifach ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \geq 2$) bzw. kleiner als 0,5fach ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \leq 0,5$) waren.

V.2.6.3.3 Überrepräsentationsanalyse

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von *SUVH2* Auswirkungen auf spezielle Genfamilien, der im WT differentiell regulierten Gene, hat, erfolgte eine sog. Überrepräsentationsanalyse. Dazu erfolgte die Berechnung eines entsprechenden *p*-Wertes (P) unter Verwendung des *right-tailed Fisher Exact Tests* mittels 2X2 Kontingenztafeln wie in (Ay et al. 2014b) beschrieben. Die erhaltenen *p*-Werte wurden nach der *Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction*-Methode (FDR Ansatz von Benjamini und Hochberg (1995); FDR = *False Discovery Rate*) korrigiert. Korrigierte *p*-Werte (*P*_c = *corrected p-value*) $< 0,05$ identifizierten Genfamilien, für die überrepräsentiert viele Mitglieder für den untersuchten Prozess reguliert sind (im WT bzw. in der *SUVH2*-oe-Linie überrepräsentiert viele Genfamilienmitglieder sind herauf- bzw. herunterreguliert). Alle Analysen erfolgten in Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

V.2.7 Primerdesign

Alle Primersequenzen wurden nach ihrem Design unter Verwendung des *BLAST tools* [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] hinsichtlich ihrer Spezifität zum korrespondierenden Gen verifiziert.

Primerdesign für Expressions- und ChIP-Analysen sowie und T-DNA-Insertionstests

Das Primerdesign erfolgte unter Verwendung der PrimerSelectTM tools (Lasergene[®] from DNASTAR; www.dnastar.com) Software. Die Sequenzen sind im Appendix unter A.8 aufgeführt. Für Expressions- und ChIP-Experimente wurden i. d. R. Primer design, die DNA-Fragmente zwischen 90 - 200 bp generierten.

Primerdesign für Bisulfitanalysen

Das Design der Primer für die Analyse der DNA-Methylierung erfolgte jeweils am kodierenden Strang von *WRKY53* (AT4G23810), *ELF5A-3* (AT1G69410) und *MULE* (AT2G15810) mit dem Software-Programm Kismeth: Bisulfite Primer Design tool (www. http://katahdin.mssm.edu/kismeth/primer_design.pl; Gruntman et al. 2008]). Um eine bevorzugte Amplifikation von methylierter oder nicht vollständig konvertierter DNA zu vermeiden, wurden dabei die Cytosine an den Primerbindestellen durch sog. degenerierte Basen ersetzt (Y für C im 5' *forward* Primer und R für G im 3' *reverse* Primer, komplementär zum sequenzierten DNA-Strang). Die Sequenzen sind im Appendix unter A.8 aufgelistet.

- LITERATURVERZEICHNIS -

- Adkins N L, Hagerman T A, Georgel P (2006):** GAGA protein: a multi-faceted transcription factor. In: *Biochem Cell Biol* 84 (4), S. 559–567.
- Agius F, Kapoor A, Zhu J-K (2006):** Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (31), S. 11796–11801.
- Alvarez-Venegas R, Abdallat A A, Guo M, Alfano J R, Avramova Z (2007):** Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. In: *Epigenetics* 2 (2), S. 106–113.
- Alvarez-Venegas R, Avramova Z (2005):** Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in atx1 mutants. In: *Nucleic Acids Res* 33 (16), S. 5199–5207.
- Aufsatz W, Stoiber T, Rakic B, Naumann K (2007):** Arabidopsis histone deacetylase 6: a green link to RNA silencing. In: *Oncogene* 26 (37), S. 5477–5488.
- Ay N, Irmeler K, Fischer A, Uhlemann R, Reuter G, Humbeck K (2009):** Epigenetic programming via histone methylation at *WRKY53* controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J* 58 (2), S. 333–346.
- Ay N, Janack B, Humbeck K (2014a):** Epigenetic control of plant senescence and linked processes. In: *J Exp Bot* 65 (14), S. 3875–3887.
- Ay N, Raum U, Balazadeh S, Seidensticker T, Fischer A, Reuter G, Humbeck K (2014b):** Regulatory Factors of Leaf Senescence are Affected in Arabidopsis Plants Overexpressing the Histone Methyltransferase SUVH2. In: *J Plant Growth Regul* 33 (1), S. 119–136.
- Bai L, Morozov A V (2010):** Gene regulation by nucleosome positioning. In: *Trends Genet* 26 (11), S. 476–483.
- Balazadeh S, Riano-Pachon D M, Mueller-Roeber B (2008):** Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1, S. 63–75.
- Baudry A, Caboche M, Lepiniec L (2006):** TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant J* 46 (5), S. 768–779.
- Baumbusch L O, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen R B (2001):** The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. In: *Nucleic Acids Res* 29 (21), S. 4319–4333.
- Becker, Walter; Apel, Klaus (1993):** Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. In: *Planta* 189 (1), S. 74–79.
- Becker W M, Reece J B, Poenie M F (1996):** *The World of the Cell*. 3rd ed. Menlo Park, Calif: Benjamin/Cummings.
- Benjamini Yoav, Hochberg Yosef (1995):** Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. In: *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1), S. 289–300.
- Berger F, Gaudin V (2003):** Chromatin dynamics and Arabidopsis development. In: *Chromosome Res* 11 (3), S. 277–304.
- Berger S L (2002):** Histone modifications in transcriptional regulation. In: *Curr Opin Genet Dev* 12 (2), S. 142–148.
- Bernatavichute Y V, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen S E (2008):** Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. In: *PLoS One* 3 (9), S. e3156.
- Bernstein E, Duncan E M, Masui O, Gil J, Heard E, Allis C D (2006):** Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. In: *Mol Cell Biol* 26 (7), S. 2560–2569.
- Berr A, Menard R, Heitz T, Shen W-H (2012):** Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of Arabidopsis defence responses upon pathogen attack. In: *Cell Microbiol* 14 (6), S. 829–839.
- Besseau S, Li J, Palva E T (2012):** *WRKY54* and *WRKY70* co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *J Exp Bot* 63 (7), S. 2667–2679.
- Bilichak A, Ilnytsky Y, Hollunder J, Kovalchuk I (2012):** The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. In: *PLoS One* 7 (1), S. e30515.
- Bird A (2002):** DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes Dev* 16 (1), S. 6–21.
- Blander G, Guarente L (2004):** The Sir2 family of protein deacetylases. In: *Annu Rev Biochem* 73, S. 417–435.
- Böhmdorfer G, Rowley M J, Kuciński J, Zhu Y, Amies I, Wierzbicki A T (2014):** RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. In: *Plant J* 79 (2), S. 181–191.

- Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascue J, Lamond A I (2007):** The multifunctional nucleolus. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (7), S. 574–585.
- Borevitz J O, Xia Y, Blount J, Dixon R A, Lamb C (2000):** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. In: *Plant Cell* 12 (12), S. 2383–2394.
- Bouche N, Lauressergues D, Gascioli V, Vaucheret H (2006):** An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. In: *EMBO J* 25 (14), S. 3347–3356.
- Boulon S, Westman B J, Hutten S, Boisvert F-M, Lamond A I (2010):** The nucleolus under stress. In: *Mol Cell* 40 (2), S. 216–227.
- Brady C J (1988):** Nucleic acid and protein synthesis. In: *In LD Nooden, AC Leopold, eds, Senescence and Aging in Plants. Academic Press, San Diego, CA*, S. 147–179.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y-S, Penfold C A, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore J D, Wild D L, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead A, Buchanan-Wollaston V (2011):** High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. In: *Plant Cell* 23 (3), S. 873–894.
- Brusslan J A, Rus Alvarez-Canterbury A M, Nair N U, Rice J C, Hitchler M J, Pellegrini M (2012):** Genome-wide evaluation of histone methylation changes associated with leaf senescence in Arabidopsis. In: *PLoS One* 7 (3), S. e33151.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003):** The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. In: *Plant Biotechnol J* 1 (1), S. 3–22.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim P O, Nam H G, Lin J F, Wu S H, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver C J (2005):** Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 42 (4), S. 567–585.
- Caldana C, Scheible W-R, Mueller-Roeber B, Ruzicic S (2007):** A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. In: *Plant Methods* 3, S. 7.
- Campanero M R, Armstrong M I, Flemington E K (2000):** CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12), S. 6481–6486.
- Cao X, Jacobsen S E (2002a):** Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, S. 16491–16498.
- Cao X, Jacobsen S E (2002b):** Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. In: *Curr Biol* 12 (13), S. 1138–1144.
- Ceribelli M, Dolfini D, Merico D, Gatta R, Viganò A M, Pavesi G, Mantovani R (2008):** The Histone-Like NF-Y Is a Bifunctional Transcription Factor. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (6), S. 2047–2058.
- Chan S W-L, Henderson I R, Jacobsen S E (2005):** Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. In: *Nat Rev Genet* 6 (5), S. 351–360.
- Charron J-B F, He H, Elling A A, Deng X W (2009):** Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 21 (12), S. 3732–3748.
- Chawla R, Nicholson S J, Folta K M, Srivastava V (2007):** Transgene-induced silencing of Arabidopsis phytochrome A gene via exonic methylation. In: *Plant J* 52 (6), S. 1105–1118.
- Chen D, Xu G, Tang W, Jing Y, Ji Q, Fei Z, Lin R (2013):** Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 25 (5), S. 1657–1673.
- Chen W, Provart N J, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham S A, Budworth P R, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps J A, Harper J F, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl J L, Wang X, Zhu T (2002):** Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. In: *The Plant Cell Online* 14 (3), S. 559–574.
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada J J, Goldberg R B, Jacobsen S E, Fischer R L (2002):** DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. In: *Cell* 110 (1), S. 33–42.
- Chomczynski P, Mackey K (1995):** Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. In: *Biotechniques* 19 (6), S. 942–945.
- Clouaire T, Stancheva I (2008):** Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? In: *Cell Mol Life Sci* 65 (10), S. 1509–1522.

- Cokus S J, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild C D, Pradhan S, Nelson S F, Pellegrini M, Jacobsen S E (2008):** Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. In: *Nature* 452 (7184), S. 215–219.
- Cui K, Zang C, Roh T-Y, Schones D E, Childs R W, Peng W, Zhao K (2009):** Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. In: *Cell Stem Cell* 4 (1), S. 80–93.
- Czechowski T, Bari R P, Stitt M, Scheible W-R, Udvardi M K (2004):** Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. In: *Plant J* 38 (2), S. 366–379.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi M K, Scheible W-R (2005):** Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. In: *Plant Physiol* 139 (1), S. 5–17.
- Damri M, Granot G, Ben-Meir H, Avivi Y, Plaschkes I, Chalifa-Caspi V, Wolfson M, Fraifeld V, Grafi G (2009):** Senescing cells share common features with dedifferentiating cells. In: *Rejuvenation Res* 12 (6), S. 435–443.
- Davuluri R V, Sun H, Palaniswamy S K, Matthews Nicole, Molina C, Kurtz M, Grotewold E (2003):** AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. In: *BMC Bioinformatics* 4, S. 25.
- De Cecco M de, Criscione S W, Peckham E J, Hillenmeyer S, Hamm E A, Manivannan J, Peterson A L, Kreiling J A, Neretti N, Sedivy J M (2013):** Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. In: *Aging Cell* 12 (2), S. 247–256.
- Delorme V G R, McCabe P F, Kim D-J, Leaver C J (2000):** A Matrix Metalloproteinase Gene Is Expressed at the Boundary of Senescence and Programmed Cell Death in Cucumber. In: *Plant Physiology* 123 (3), S. 917–928.
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry J F, Masclaux-Daubresse C (2006):** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cell Physiol* 47 (1), S. 74–83.
- Diaz-Sala C, Rey M, Boronat A, Besford R, Rodriguez R (1995):** Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential in vitro subcultures. In: *Plant Cell Rep* 15 (3-4), S. 218–221.
- Dona M, Confalonieri M, Minio A, Biggiogera M, Buttafava A, Raimondi E, Delledonne M, Ventura L, Sabatini M E, Macovei A, Giraffa G, Carbonera D, Balestrazzi A (2013):** RNA-Seq analysis discloses early senescence and nucleolar dysfunction triggered by Tdp1alpha depletion in *Medicago truncatula*. In: *J Exp Bot* 64 (7), S. 1941–1951.
- Dowen R H, Pelizzola M, Schmitz, R J, Lister R, Dowen J M, Nery J R, Dixon J E, Ecker J R (2012):** Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (32), S. E2183-91.
- Drumm A, Nagl W (1982):** Loss of DNA and euchromatin in senescing leaf cells of *Allium*. In: *Mech Ageing Dev* 18 (2), S. 103–110.
- Earley K W, Pontvianne F, Wierzbicki A T, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard C S (2010):** Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. In: *Genes Dev* 24 (11), S. 1119–1132.
- Ebbs M L, Bartee L, Bender J (2005):** H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. In: *Mol Cell Biol* 25 (23), S. 10507–10515.
- Ebbs M L, Bender J (2006):** Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. In: *Plant Cell* 18 (5), S. 1166–1176.
- Eberharter A, Becker P B (2002):** Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. In: *EMBO Rep* 3 (3), S. 224–229.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004):** Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. In: *Genes Dev* 18 (23), S. 2973–2983.
- Eckardt N A (2009):** A New Chlorophyll Degradation Pathway. In: *The Plant Cell Online* 21 (3), S. 700.
- Feng S, Cokus S J, Zhang X, Chen P-Y, Bostick M, Goll M G, Hetzel J, Jain J, Strauss S H, Halpern M E, Ukomadu C, Sadler K C, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen S E (2010):** Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (19), S. 8689–8694.
- Feser J, Tyler J (2011):** Chromatin structure as a mediator of aging. In: *FEBS Lett* 585 (13), S. 2041–2048.
- Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S (1996):** Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (16), S. 8449–8454.
- Fraga M F, Rodriguez R, Canal M J (2002):** Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. In: *Tree Physiol* 22 (11), S. 813–816.

- Franz P F, Armstrong S, de Jong J H, Parnell L D, van Drunen C, Dean C, Zabel P, Bisseling T, Jones G H (2000):** Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. In: *Cell* 100 (3), S. 367–376.
- Franz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer T C, Torres-Ruiz R A, Jones G (1998):** Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 13 (6), S. 867–876.
- Franz P, de Jong J H, Lysak M, Castiglione M R, Schubert I (2002):** Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (22), S. 14584–14589.
- Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I (2006):** Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. In: *Trends Plant Sci* 11 (4), S. 199–208.
- Gan E-S, Huang J, Ito T (2013):** Functional roles of histone modification, chromatin remodeling and microRNAs in *Arabidopsis* flower development. In: *Int Rev Cell Mol Biol* 305, S. 115–161.
- Gan S, Amasino R M (1997):** Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). In: *Plant Physiol* 113 (2), S. 313–319.
- Gehring M, Henikoff S (2007):** DNA methylation dynamics in plant genomes. In: *Biochim Biophys Acta* 1769 (5-6), S. 276–286.
- Gehring M, Huh J H, Hsieh T-F, Penterman J, Choi Y, Harada J J, Goldberg R B, Fischer R L (2006):** DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. In: *Cell* 124 (3), S. 495–506.
- Gendrel A-V, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R A (2002):** Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. In: *Science* 297 (5588), S. 1871–1873.
- Gepstein S, Glick B R (2013):** Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. In: *Plant Mol Biol* 82 (6), S. 623–633.
- Gepstein S, Sabeji, G, Carp M-J, Hajouj T, Neshier M F O, Yariv I, Dor C, Bassani M (2003):** Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. In: *Plant J* 36 (5), S. 629–642.
- Grunstein M (1997):** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. In: *Nature* 389 (6649), S. 349–352.
- Gruntman E, Qi Y, Slotkin R K, Roeder T, Martienssen R A, Sachidanandam R (2008):** Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. In: *BMC Bioinformatics* 9, S. 371.
- Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L, Luo J (2005):** DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. In: *Bioinformatics* 21(10), S. 2568–2569.
- Guo Y (2013):** Towards systems biological understanding of leaf senescence. In: *Plant Mol Biol* 82 (6), S. 519–528.
- Guo Y, Gan S (2005):** Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation. In: Gerald P. Schatten (Hg.): *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 71: Academic Press, S. 83–112.
- Guo Y, Gan S (2006):** AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. In: *Plant J* 46 (4), S. 601–612.
- Guo Y, Gan S (2012):** Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. In: *Plant, Cell & Environment* 35 (3), S. 644–655.
- Guo Y, Cai Z, Gan S (2004):** Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. In: *Plant, Cell & Environment* 27 (5), S. 521–549.
- Ha M, Ng D W-K, Li W-H, Chen Z J (2011):** Coordinated histone modifications are associated with gene expression variation within and between species. In: *Genome Res* 21 (4), S. 590–598.
- Haithecock E, Dayani Y, Neufeld E, Zahand A J, Feinstein N, Mattout A, Gruenbaum Y, Liu J (2005):** Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (46), S. 16690–16695.
- He G, Zhu X, Elling A A, Chen L, Wang X, Guo L, Liang M, He H, Zhang H, Chen F, Qi Y, Chen R, Deng X W (2010):** Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. In: *Plant Cell* 22 (1), S. 17–33.
- He X-J, Chen T, Zhu J-K (2011):** Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. In: *Cell Res* 21 (3), S. 442–465.
- He Y, Tang W, Swain J D, Green A L, Jack T P, Gan S (2001):** Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. In: *Plant Physiol* 126 (2), S. 707–716.

- He Y, Doyle M R, Amasino R M (2004):** PAF1-complex-mediated histone methylation of FLOWERING LOCUS C chromatin is required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis. In: *Genes Dev* 18 (22), S. 2774–2784.
- Henderson I R, Jacobsen S E (2007):** Epigenetic inheritance in plants. In: *Nature* 447 (7143), S. 418–424.
- Hensel L L, Grbić V, Baumgarten D A, Bleecker A B (1993):** Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in arabidopsis. In: *The Plant Cell Online* 5 (5), S. 553–564.
- Hetzl J, Foerster A M, Raidl G, Mittelsten-Scheid O (2007):** CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. In: *Plant J* 51 (3), S. 526–536.
- Himelblau E, Amasino R M (2001):** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. In: *J. Plant. Physiol.* (158), S. 1317–1323.
- Hinderhofer K, Zentgraf U (2001):** Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. In: *Planta* 213 (3), S. 469–473.
- Hoch W A, Singsaas E L, McCown Brent H (2003):** Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. In: *Plant Physiol* 133 (3), S. 1296–1305.
- Hofmann I (2004):** Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten für Transcriptional Gene Silencing in *Arabidopsis thaliana*. Martin-Luther-Universität, Halle. Fachbereich Biochemie/Biotechnologie.
- Hoekenga O A, Muszynski M G, Cone K C (2000):** Developmental patterns of chromatin structure and DNA methylation responsible for epigenetic expression of a maize regulatory gene. In: *Genetics* 155 (4), S. 1889–1902.
- Hoertensteiner S (2006):** Chlorophyll degradation during senescence. In: *Annu Rev Plant Biol* 57, S. 55–77.
- Hoertensteiner S (2013):** Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. In: *Plant Mol Biol* 82 (6), S. 505–517.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008):** Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. In: *Adv Bioinformatics* 2008, S. 420747.
- Hu, Y, Dong Q, Yu D (2012):** Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. In: *Plant Sci* 185-186, S. 288–297.
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K (2005):** RARTE: Database and Tools for Complete Sets of Arabidopsis Transcription Factors. In: *DNA Research* 12 (4), S. 247–256.
- Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009):** Arabidopsis WUSCHEL Is a Bifunctional Transcription Factor That Acts as a Repressor in Stem Cell Regulation and as an Activator in Floral Patterning. In: *The Plant Cell Online* 21 (11), S. 3493–3505.
- Inamdar N M, Ehrlich K C, Ehrlich M (1991):** CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. In: *Plant Mol Biol* 17 (1), S. 111–123.
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson M R, Mae T (2008):** Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. In: *Plant Physiol* 148 (1), S. 142–155.
- Ito M, Koike A, Koizumi N, Sano H (2003):** Methylated DNA-binding proteins from Arabidopsis. In: *Plant Physiol* 133 (4), S. 1747–1754.
- Jackson J P, Lindroth A M, Cao X, Jacobsen S E (2002):** Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. In: *Nature* 416 (6880), S. 556–560.
- Jackson J P, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh P, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T, Jacobsen S E (2004):** Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. In: *Chromosoma* 112 (6), S. 308–315.
- Jaradat M R, Feurtado J A, Huang D, Lu Y, Cutler A J (2013):** Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. In: *BMC Plant Biol* 13, S. 192.
- Jarillo J A, Pineiro M, Cubas P, Martinez-Zapater J M (2009):** Chromatin remodeling in plant development. In: *Int J Dev Biol* 53 (8-10), S. 1581–1596.
- Jasencakova Z, Soppe W J J, Meister A, Gernand D, Turner B M, Schubert I (2003):** Histone modifications in Arabidopsis- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. In: *Plant J* 33 (3), S. 471–480.
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhansel C (2011):** Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. In: *EMBO Rep* 12 (1), S. 50–55.

- Jeddeloh J A, Stokes T L, Richards E J (1999):** Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. In: *Nat Genet* 22 (1), S. 94–97.
- Jenuwein T, Allis C D (2001):** Translating the histone code. In: *Science* 293 (5532), S. 1074–1080.
- Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G (1998):** SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. In: *Cell Mol Life Sci* 54 (1), S. 80–93.
- Jerzmanowski A (2007):** SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. In: *Biochim Biophys Acta* 1769 (5-6), S. 330–345.
- Jibrán R, Hunter A D, Dijkwel P P (2013):** Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. In: *Plant Mol Biol* 82 (6), S. 547–561.
- Jin J, Zhang H, Kong L, Gao G, Luo J (2014):** PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. In: *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue), S. D1182-7.
- Jing H-C, Schippers J H M, Hille J, Dijkwel P P (2005):** Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. In: *Journal of Experimental Botany* 56 (421), S. 2915–2923.
- John C F, Morris K, Jordan B R, Thomas B, A-H-Mackerness S (2001):** Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *J Exp Bot* 52 (359), S. 1367–1373.
- Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R (2002):** TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. In: *Plant Cell* 14 (6), S. 1359–1375.
- Johnson L M, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J, Jacobsen S E (2007):** The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. In: *Curr Biol* 17 (4), S. 379–384.
- Johnson L M, Law, J A, Khattar A, Henderson I R, Jacobsen S E (2008):** SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. In: *PLoS Genet* 4 (11), S. e1000280.
- Jones A M (2001):** Programmed Cell Death in Development and Defense. In: *Plant Physiology* 125 (1), S. 94–97.
- Joulie M, Miotto B, Defossez P-A (2010):** Mammalian methyl-binding proteins: what might they do? In: *Bioessays* 32 (12), S. 1025–1032.
- Kagale S, Links, M G, Rozwadowski K (2010):** Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. In: *Plant Physiol* 152 (3), S. 1109–1134.
- Kagale S, Rozwadowski K (2011):** EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. In: *Epigenetics* 6 (2), S. 141–146.
- Kalamajka R, Hahnen S, Cavalari M, Töpsch S, Weier D, Peterhänsel C (2003):** Restriction accessibility in isolated nuclei reveals light-induced chromatin reorganization at the PEPC promoter in maize. In: *Plant Mol Biol* 52 (3), S. 669–678.
- Kanno T, Aufsatz W, Jaligot E, Mette M F, Matzke M, Matzke A J M (2005):** A SNF2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation. In: *EMBO Rep* 6 (7), S. 649–655.
- Karan R, DeLeon T, Biradar H, Subudhi P K (2012):** Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. In: *PLoS One* 7 (6), S. e40203.
- Kaup M T, Froese C D, Thompson J E (2002):** A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. In: *Plant Physiol* 129 (4), S. 1616–1626.
- Kleinboelting N, Huep G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B (2012):** GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. In: *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue), S. D1211-5.
- Klose R J, Bird A P (2006):** Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. In: *Trends Biochem Sci* 31 (2), S. 89–97.
- Kobayashi T (2008):** A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus-rDNA instability maintains genome integrity. In: *Bioessays* 30 (3), S. 267–272.
- Kolodziejek I, Koziol-Lipinska J, Waleza M, Korczynski J, Mostowska A (2007):** Aspects of programmed cell death during early senescence of barley leaves: possible role of nitric oxide. In: *Protoplasma* 232 (1-2), S. 97–108.
- Koornneef M, van der Veen J H (1980):** Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. In: *Theor Appl Genet* 58 (6), S. 257–263.
- Kouzarides T (2007):** Chromatin modifications and their function. In: *Cell* 128 (4), S. 693–705.
- Koyama T, Nii H, Mitsuda N, Ohta M, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F (2013):** A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence. In: *Plant Physiol* 162 (2), S. 991–1005.

- Kuhlmann M, Mette M F (2012):** Developmentally non-redundant SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Mol Biol* 79 (6), S. 623–633.
- Lachner M, O'Sullivan R J, Jenuwein T (2003):** An epigenetic road map for histone lysine methylation. In: *J Cell Sci* 116 (Pt 11), S. 2117–2124.
- Lafos M, Kroll P, Hohenstatt M L, Thorpe F L, Clarenz O, Schubert D (2011):** Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation. In: *PLoS Genet* 7 (4), S. e1002040.
- Larson K, Yan S-J, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, Guo D, Eickbush T H, Li W X (2012):** Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. In: *PLoS Genet* 8 (1), S. e1002473.
- Lauria M, Rossi V (2011):** Epigenetic control of gene regulation in plants. In: *Biochim Biophys Acta* 1809 (8), S. 369–378.
- Law J A, Jacobsen S E (2010):** Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. In: *Nat Rev Genet* 11 (3), S. 204–220.
- Lawrence R J, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen Z J, Neves N, Viegas W, Pikaard C S (2004):** A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. In: *Mol Cell* 13 (4), S. 599–609.
- Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng X W (2007):** Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. In: *Plant Cell* 19 (3), S. 731–749.
- Lee R-H, Chen S-C G (2002):** Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. In: *New Phytologist* 155 (1), S. 25–32.
- Leopold A C (1961):** Senescence in Plant Development: The death of plants or plant parts may be of positive ecological or physiological value. In: *Science* 134 (3492), S. 1727–1732.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J-M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006):** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. In: *Annu Rev Plant Biol* 57, S. 405–430.
- Li C F, Pontes O, El-Shami M, Henderson I R, Bernatavichute Y V, Chan SW, Lagrange T, Pikaard C S, Jacobsen S E (2006a):** An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. In: *Cell* 126 (1), S. 93–106.
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva E T (2006b):** WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. In: *Plant J* 46 (3), S. 477–491.
- Li X, Wang X, He K, Ma Y, Su N, He H, Stolc V, Tongprasit W, Jin W, Jiang J, Terzaghi W, Li S, Deng X W (2008):** High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. In: *Plant Cell* 20 (2), S. 259–276.
- Lim P O, Kim H J, Gil Nam H (2007a):** Leaf Senescence. In: *Annual Review of Plant Biology* 58 (1), S. 115–136.
- Lim P O, Kim Y, Breeze E, Koo J C, Woo H R, Ryu J S, Park D H, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V, Nam H G (2007b):** Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. In: *Plant J* 52 (6), S. 1140–1153.
- Lister R, O'Malley R C, Tonti-Filippini J, Gregory B D, Berry C C, Millar A H, Ecker J R (2008):** Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. In: *Cell* 133 (3), S. 523–536.
- Liu C, Lu F, Cui X, Cao X (2010):** Histone methylation in higher plants. In: *Annu Rev Plant Biol* 61, S. 395–420.
- Liu N, Fromm M, Avramova Z (2014):** H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. In: *Mol Plant* 7 (3), S. 502–513.
- Liu X, Luo M, Wu K (2012):** Epigenetic interplay of histone modifications and DNA methylation mediated by HDA6. In: *Plant Signal Behav* 7 (6), S. 633–635.
- Lohman K N, Gan S, John M C, Amasino R M (1994):** Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. In: *Physiologia Plantarum* 92 (2), S. 322–328.
- Loidl P (2004):** A plant dialect of the histone language. In: *Trends Plant Sci* 9 (2), S. 84–90.
- Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X (2011):** *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. In: *Nat Genet* 43 (7), S. 715–719.
- Luger K, Mader A W, Richmond R K, Sargent D F, Richmond T J (1997):** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* 389 (6648), S. 251–260.
- Luo M, Liu X, Singh P, Cui Y, Zimmerli L, Wu K (2012):** Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. In: *Biochim Biophys Acta* 1819 (2), S. 129–136.

- Maier A, Schrader A, Kokkelink L, Falke C, Welter B, Iniesto E, Rubio V, Uhrig J F, Hülskamp M, Hoecker U (2013):** Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in Arabidopsis. In: *Plant J* 74 (4), S. 638–651.
- Makino A, Osmond B (1991):** Solubilization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from the membrane fraction of pea leaves. In: *Photosynth Res* 29 (2), S. 79–85.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison J S (1991):** Localization of tandemly repeated DMA sequences in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 1 (2), S. 159–166.
- Manavella P A, Koenig D, Rubio-Somoza I, Burbano H A, Becker C, Weigel D (2013):** Tissue-specific silencing of Arabidopsis SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 by miR171a. In: *Plant Physiol* 161 (2), S. 805–812.
- Mathieu O, Probst A V, Paszkowski J (2005):** Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. In: *EMBO J* 24 (15), S. 2783–2791.
- McCull G, Killilea D W, Hubbard A E, Vantipalli M C, Melov S, Lithgow G J (2008):** Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis elegans*. In: *J Biol Chem* 283 (1), S. 350–357.
- Mehta I S, Figgitt M, Clements C S, Kill I R, Bridger J M (2007):** Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. In: *Ann N Y Acad Sci* 1100, S. 250–263.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U (2004):** Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. In: *Plant Mol Biol* 55 (6), S. 853–867.
- Miao Y, Laun T M, Smykowski A, Zentgraf U (2007):** Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. In: *Plant Mol Biol* 65 (1-2), S. 63–76.
- Miao Y, Zentgraf U (2007):** The antagonist function of Arabidopsis WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. In: *Plant Cell* 19 (3), S. 819–830.
- Miao Y, Zentgraf U (2010):** A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. In: *Plant J* 63 (2), S. 179–188.
- Miersch I, Heise J, Zelmer I, Humbeck K (2000):** Differential Degradation of the Photosynthetic Apparatus During Leaf Senescence in Barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Plant Biology* 2 (6), S. 618–623.
- Migicovsky Z, Yao Y, Kovalchuk I (2014):** Transgenerational phenotypic and epigenetic changes in response to heat stress in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Signal Behav* 9, S. e27971.
- Mikkelsen T S, Ku M, Jaffe D B, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim T K, Koche R P, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander E S, Bernstein B E (2007):** Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. In: *Nature* 448 (7153), S. 553–560.
- Miller J D, Arteca R N, Pell E J (1999):** Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. In: *Plant Physiol* 120 (4), S. 1015–1024.
- Mindrinos M, Katagiri F, Yu G L, Ausubel F M (1994):** The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. In: *Cell* 78 (6), S. 1089–1099.
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009):** Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. In: *Plant Cell Physiol*. 50 (7), S. 1232–1248.
- Moritoh S, Eun C-H, Ono A, Asao H, Okano Y, Yamaguchi K, Shimatani Z, Koizumi A, Terada R (2012):** Targeted disruption of an orthologue of DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2, OsDRM2, impairs the growth of rice plants by abnormal DNA methylation. In: *Plant J* 71 (1), S. 85–98.
- Mülhardt C (2006):** Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. fünfte Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Murashige T, Skoog F (1962):** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. In: *Physiologia Plantarum* 15 (3), S. 473–497.
- Nagaki K, Talbert P B, Zhong C X, Dawe R K, Henikoff S, Jiang J (2003):** Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. In: *Genetics* 163 (3), S. 1221–1225.
- Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin A W, Hearn S A, Spector D L, Hannon G J, Lowe S W (2003):** Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. In: *Cell* 13;113(6); S.703-716.
- Naumann K (2006):** Molekulargenetische und funktionelle Analyse von SUVH2, einem SU(VAR)3-9 homologen Protein in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg. Fachbereich Biologie.

- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich A C, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G (2005):** Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. In: *EMBO J* 24 (7), S. 1418-1429.
- Noh Y S, Amasino R M (1999):** Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. In: *Plant Mol Biol* 41 (2), S. 181-194.
- Noodén L D, Guiamét J J, John I (1997):** Senescence mechanisms. In: *Physiologia Plantarum* 101 (4), S. 746-753.
- Noodén L D, Penney J P (2001):** Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). In: *Journal of Experimental Botany* 52 (364), S. 2151-2159.
- Noodén L D, Leopold A C (Hg.) (1988):** Senescence and aging in plants. In LD Noodén, AC Leopold, eds, *Senescence and Aging in Plants*. (1988).
- Oberdoerffer P, Sinclair D A (2007):** The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9), S. 692-702.
- O'Connor T R, Dyreson C, Wyrick J J (2005):** Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. In: *Bioinformatics* 21 (24), S. 4411-4413.
- Olson M O, Dundr M, Szebeni A (2000):** The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. In: *Trends Cell Biol* 10 (5), S. 189-196.
- Ortega-Galisteo A P, Morales-Ruiz T, Ariza R R, Roldan-Arjona T (2008):** Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. In: *Plant Mol Biol* 67 (6), S. 671-681.
- Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, Deng X W (2000):** Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. In: *Nature* 405 (6785), S. 462-466.
- Park J H, Oh S A, Kim Y H, Woo H R, Nam, H G (1998):** Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. In: *Plant Mol Biol* 37 (3), S. 445-454.
- Pavet V, Quintero C, Cecchini N M, Rosa A L, Alvarez M E (2006):** Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. In: *Mol Plant Microbe Interact* 19 (6), S. 577-587.
- Pecinka A, Dinh H Q, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Mittelsten-Scheid O (2010):** Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 22 (9), S. 3118-3129.
- Pecinka A, Mittelsten-Scheid O (2012):** Stress-Induced Chromatin Changes: A Critical View on Their Heritability. In: *Plant and Cell Physiology* 53 (5), S. 801-808.
- Penterman J, Zilberman D, Huh J H, Ballinger T, Henikoff S, Fischer R L (2007):** DNA demethylation in the Arabidopsis genome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (16), S. 6752-6757.
- Perez-Amador M A, Abler M L, De Rocher E J, Thompson D M, van Hoof A, LeBrasseur N D, Lers A, Green P J (2000):** Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. In: *Plant Physiol* 122 (1), S. 169-180.
- Pérez-Rodríguez P, Riaño-Pachón D M, Corrêa L G G, Rensing S A, Kersten B, Mueller-Roeber B (2010):** PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. In: *Nucleic Acids Research* 38 (suppl 1), S. D822-D827.
- Pien S, Grossniklaus U (2007):** Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. In: *Biochim Biophys Acta* 1769 (5-6), S. 375-382.
- Pontes Olga, Li C F, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen S E, Pikaard C S (2006):** The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. In: *Cell* 126 (1), S. 79-92.
- Probst A V, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence R J, Pikaard C S, Murfett J, Furner I, Vaucheret H, Mittelsten-Scheid O (2004):** Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. In: *Plant Cell* 16 (4), S. 1021-1034.
- Rajakumara E, Law J A, Simanshu D K, Voigt P, Johnson L M, Reinberg D, Patel D J, Jacobsen S E (2011):** A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the Arabidopsis SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. In: *Genes Dev* 25 (2), S. 137-152.
- Ramakers C, Ruijter J M, Deprez R H L, Moorman A F M (2003):** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. In: *Neurosci Lett* 339 (1), S. 62-66.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl B D, Sun Z W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting C P, Allis C D, Jenuwein T (2000):** Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. In: *Nature* 406 (6796), S. 593-599.

- Reape T J, McCabe P F (2008):** Apoptotic-like programmed cell death in plants. In: *New Phytologist* 180 (1), S. 13–26.
- Rehrauer H, Aquino C, Gruissem W, Henz S R, Hilson P, Laubinger S, Naouar N, Patrignani A, Rombauts S, Shu H, Van de Peer Y, Vuylsteke M, Weigel D, Zeller G, Hennig L (2010):** AGRONOMICS1: a new resource for Arabidopsis transcriptome profiling. In: *Plant Physiol* 152 (2), S. 487–499.
- Reuter G, Spierer P (1992):** Position effect variegation and chromatin proteins. In: *Bioessays* 14 (9), S. 605–612.
- Richards E J (1997):** DNA methylation and plant development. In: *Trends Genet* 13 (8), S. 319–323.
- Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K, Yu G (2000):** Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. In: *Science* 290 (5499), S. 2105–2110.
- Robatzek S, Somssich I E (2001):** A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. In: *Plant J* 28 (2), S. 123–133.
- Robatzek S, Somssich I E (2002):** Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. In: *Genes Dev* 16 (9), S. 1139–1149.
- Roudier F, Ahmed I, Berard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Després B, Drevensek S, Barneche F, Dèrozier S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette M L, Robin S, Caboche M, Colot V (2011):** Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. In: *EMBO J* 30 (10), S. 1928–1938.
- Saeed A I, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003):** TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. In: *Biotechniques* 34 (2), S. 374–378.
- Saeed A I, Bhagabati N K, Braisted J C, Liang W, Sharov V, Howe E A, Li J, Thiagarajan M, White J A, Quackenbush J (2006):** TM4 microarray software suite. In: *Methods Enzymol* 411, S. 134–193.
- Sambrook J, Russel D W (2001):** Molecular cloning: a laboratory manual. 3. Auflage: Cold Spring Harbor Verlag.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12), S. 5463–5467.
- Saze H, Tsugane K, Kanno T, Nishimura T (2012):** DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. In: *Plant Cell Physiol* 53 (5), S. 766–784.
- Scebba F, Bernacchia G, Bastiani M de, Evangelista M, Cantoni R M, Cella R, Locci M T, Pitto L (2003):** Arabidopsis MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization. In: *Plant Mol Biol* 53 (5), S. 715–731.
- Schmid M, Davison T S, Henz S R, Pape U J, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann J U (2005):** A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. In: *Nat Genet* 37 (5), S. 501–506.
- Schmitges F W, Prusty A B, Faty M, Stutzer A, Lingaraju G M, Aiwezian J, Sack R, Hess D, Li L, Zhou S, Bunker R D, Wirth U, Bouwmeester T, Bauer A, Ly-Hartig N, Zhao K, Chan H, Gu J, Gut H, Fischle W, Müller J, Thomä N H (2011):** Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. In: *Mol Cell* 42 (3), S. 330–341.
- Schopfer P (1989):** Experimentelle Pflanzenphysiologie. Berlin: Springer Verlag.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002):** Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. In: *EMBO J* 21 (5), S. 1121–1131.
- Schubert D, Primavesi L, Bishopp A, Roberts G, Doonan J, Jenuwein T, Goodrich J (2006):** Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. In: *EMBO J* 25 (19), S. 4638–4649.
- Sedivy J M, Banumathy G, Adams P D (2008):** Aging by epigenetics—a consequence of chromatin damage? In: *Exp Cell Res* 314 (9), S. 1909–1917.
- Segal E, Widom J (2009):** What controls nucleosome positions? In: *Trends Genet* 25 (8), S. 335–343.
- Sequeira-Mendes J, Araguez I, Peiro R, Mendez-Giraldez R, Zhang X, Jacobsen S E, Bastolla U, Gutierrez C (2014):** The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. In: *Plant Cell* 26 (6), S. 2351–2366.
- Seto E, Yoshida M (2014):** Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (4), S. a018713.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine J R, Cole P A, Casero R A, Shi Y (2004):** Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. In: *Cell* 119 (7), S. 941–953.

- Shin D H, Choi M, Kim K, Bang G, Cho M, Choi S-B, Choi G, Park Y I (2013):** HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in Arabidopsis. In: *FEBS Lett* 587 (10), S. 1543–1547.
- Shin J, Park E, Choi G, (2007):** PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis. In: *Plant J* 49 (6), S. 981–994.
- Sidler C, Woycicki R, Kovalchuk I, Kovalchuk O (2014):** WI-38 senescence is associated with global and site-specific hypomethylation. In: *Aging (Albany NY)* 6 (7), S. 564–574.
- Smart C M (1994):** Gene expression during leaf senescence. In: *New Phytologist* 126 (3), S. 419–448.
- Smart C M, Hosken S E, Thomas H, Greaves J A, Blair B G, Schuch W (1995):** The timing of maize leaf senescence and characterisation of senescence-related cDNAs. In: *Physiologia Plantarum* 93 (4), S. 673–682.
- Strahl B D, Allis C D (2000):** The language of covalent histone modifications. In: *Nature* 403 (6765), S. 41–45.
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, Patel D J, Jacobsen S E (2014):** Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. In: *Nat Struct Mol Biol* 21 (1), S. 64–72.
- Stroud H, Greenberg M V C, Feng S, Bernatavichute Y V, Jacobsen S E (2013):** Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. In: *Cell* 152 (1-2), S. 352–364.
- Suzuki M M, Bird A (2008):** DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. In: *Nat Rev Genet* 9 (6), S. 465–476.
- Swanson E C, Manning B, Zhang H, Lawrence J B (2013):** Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. In: *J Cell Biol* 203 (6), S. 929–942.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang J S, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011):** Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. In: *Cell* 146 (6), S. 1016–1028.
- Tariq M, Paszkowski J (2004):** DNA and histone methylation in plants. In: *Trends Genet* 20 (6), S. 244–251.
- Taverna S D, Li H, Ruthenburg A J, Allis C D, Patel D J (2007):** How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (11), S. 1025–1040.
- Taylor C B, Bariola P A, delCardayré S B, Raines R T, Green P J (1993):** RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (11), S. 5118–5122.
- Tessadori F, Schulkes R K, van Driel R, Fransz P (2007):** Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 50 (5), S. 848–857.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000):** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature* 408 (6814), S. 796–815.
- Thomas H, Ougham H J, Wagstaff C, Stead A D (2003):** Defining senescence and death. In: *Journal of Experimental Botany* 54 (385), S. 1127–1132.
- Thomas H, Donnison I (2000):** Back from the brink: plant senescence and its reversibility. In: *Programmed cell death in Animals and Plants* (eds, Bryant J A, Hughes S G, Garland J M) BIOS Scientific Publishers, Oxford, S. 149–162.
- Thorstensen T, Grini P E, Aalen R B (2011):** SET domain proteins in plant development. In: *Biochim Biophys Acta* 1809 (8), S. 407–420.
- Tian L, Chen Z J (2001):** Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (1), S. 200–205.
- Tissenbaum H A, Guarente L (2001):** Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 410 (6825), S. 227–230.
- To T K, Kim J-M, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo T, Kakutani T, Toyoda T, Kimura H, Yokoyama S, Shinozaki K, Seki M (2011):** Arabidopsis HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. In: *PLoS Genet* 7 (4), S. e1002055.
- Tripoulas N, LaJeunesse D, Gildea J, Shearn A (1996):** The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. In: *Genetics* 143 (2), S. 913–928.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G (1994):** The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. In: *EMBO J* 13 (16), S. 3822–3831.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren M E, Borchers C H, Tempst P, Zhang Y (2006):** Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. In: *Nature* 439 (7078), S. 811–816.

- Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette M-L, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen R A, Coupland G, Colot V (2007):** Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. In: *PLoS Genet* 3 (6), S. e86.
- Ulker B, Shahid Mukhtar M, Somssich I E (2007):** The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. In: *Planta* 226 (1), S. 125–137.
- Upadhyay R K, Gupta A, Ranjan S, Singh R, Pathre U V, Nath P, Sane A P (2014):** The EAR motif controls the early flowering and senescence phenotype mediated by over-expression of SIERF36 and is partly responsible for changes in stomatal density and photosynthesis. In: *PLoS One* 9 (7), S. e101995.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge U-I, Kunze R (2006):** Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. In: *Plant Physiol* 141 (2), S. 776–792.
- Villeponteau B (1997):** The heterochromatin loss model of aging. In: *Exp Gerontol* 32 (4-5), S. 383–394.
- Wagner D (2003):** Chromatin regulation of plant development. In: *Curr Opin Plant Biol* 6 (1), S. 20–28.
- Warner N M (2008):** Unravelling the Roles of Two Senescent Enhanced MYB Transcription Factors in the Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Thesis. University of Warwick. Online verfügbar unter http://wrap.warwick.ac.uk/8731/WRAP_THESIS_Warner_2008.pdf, zuletzt geprüft am 11.10.2014.
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie A R, Hoefgen R (2013):** Comprehensive Dissection of Spatiotemporal Metabolic Shifts in Primary, Secondary, and Lipid Metabolism during Developmental Senescence in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 162 (3), S. 1290–1310.
- Weaver L M, Gan S, Quirino B, Amasino R M (1998):** A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. In: *Plant Mol Biol* 37 (3), S. 455–469.
- Wollmann H, Holec S, Alden K, Clarke N D, Jacques P-E, Berger F (2012):** Dynamic deposition of histone variant H3.3 accompanies developmental remodeling of the Arabidopsis transcriptome. In: *PLoS Genet* 8 (5), S. e1002658.
- Woo H R, Dittmer T A, Richards E J (2008):** Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in Arabidopsis. In: *PLoS Genet* 4 (8), S. e1000156.
- Woo H R, Kim H J, Nam H G, Lim P O (2013):** Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. In: *J. Cell. Sci.* 126 (Pt 21), S. 4823–4833.
- Woo H R, Kim J H; Kim J, Kim J, Lee U, Song I-J, Kim J H, Lee H Y, Nam H G, Lim P O. (2010):** The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in Arabidopsis. In: *Journal of Experimental Botany* 61 (14), S. 3947–3957.
- Wu A, Allu A D, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanon M-I, Asensi-Fabado M A, Munné-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie A R, Kaufmann K, Xue G P, Mueller-Roeber B, Balazadeh S (2012):** JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. In: *Plant Cell* 24 (2), S. 482–506.
- Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu C-W, Chaikam V (2008):** HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. In: *J Exp Bot* 59 (2), S. 225–234.
- Xu W, Grain D, Le Gourrierc J, Harscoet E, Berger A, Jauvion V, Scagnelli A, Berger N, Bidzinski P, Kelemen Z, Salsac F, Baudry A, Routaboul J M, Lepiniec L, Dubos C (2013):** Regulation of flavonoid biosynthesis involves an unexpected complex transcriptional regulation of TT8 expression, in Arabidopsis. In: *New Phytol* 198 (1), S. 59–70.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006):** JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. In: *Cell* 125 (3), S. 483–495.
- Yilmaz A, Mejia-Guerra M K, Kurz K, Liang X, Welch L, Grotewold E (2011):** AGRIS: the Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an update. In: *Nucleic Acids Res.* 39 (Database issue), S. D1118–1122.
- Zavaleta-Mancera H A, Thomas B J, Thomas H, Scott I M (1999):** Regreening of senescent Nicotiana leaves: II. Redifferentiation of plastids. In: *Journal of Experimental Botany* 50 (340), S. 1683–1689.
- Zemach A, Grafi G (2003):** Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. In: *Plant J* 34 (5), S. 565–572.
- Zemach A, Grafi G (2007):** Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. In: *Trends Plant Sci* 12 (2), S. 80–85.
- Zemach A, Kim M Y, Hsieh P-H, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer S L, Zilberman D (2013):** The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. In: *Cell* 153 (1), S. 193–205.
- Zentgraf U, Laun T, Miao Y (2010):** The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. In: *Eur J Cell Biol* 89 (2-3), S. 133–137.

- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne C T, Lloyd A (2003):** A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. In: *Development* 130 (20), S. 4859–4869.
- Zhang M, Kimatu J N, Xu K, Liu B (2010):** DNA cytosine methylation in plant development. In: *Journal of Genetics and Genomics* 37 (1), S. 1–12.
- Zhang X, Jacobsen S E (2006):** Genetic analyses of DNA methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, S. 439–447.
- Zhang X, Ju H-W, Chung M-S, Huang P, Ahn S-J, Kim C S (2011):** The R-R-type MYB-like transcription factor, AtMYBL, is involved in promoting leaf senescence and modulates an abiotic stress response in Arabidopsis. In: *Plant Cell Physiol* 52 (1), S. 138–148.
- Zhang X, Bernatavichute Y V, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen S E (2009):** Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. In: *Genome Biol* 10 (6), S. 1-14.
- Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute Y V, Pellegrini M, Goodrich J, Jacobsen S E (2007):** Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. In: *PLoS Biology* 5 (5), S. 1026–1035.
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan S W-L, Chen H, Henderson I R, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S E, Ecker J R (2006):** Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. In: *Cell* 126 (6), S. 1189–1201.
- Zhou H, Hu Hu, Lai M (2010a):** Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. In: *Biol Cell* 102 (12), S. 645–655.
- Zhou J, Wang X, He K, Charron J-B F, Elling A A, Deng X W (2010b):** Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. In: *Plant Mol Biol* 72 (6), S. 585–595.
- Zhou J, Wang X, He K, Charron J-B F, Elling A A, Deng X W (2010c):** Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. In: *Plant Mol Biol* 72 (6), S. 585-595.
- Zhou V W, Goren A, Bernstein B E (2011):** Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. In: *Nat Rev Genet* 12 (1), S. 7–18.
- Zhou C, Gan S (Hg.) (2009):** Senescence, in: E.C. Pua, M.R. Davey (Eds.), *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, S.151–169.
- Zilberman D, Gehring M, Tran R K, Ballinger T, Henikoff S (2007):** Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. In: *Nat Genet* 39 (1), S. 61–69.
- Zimmermann I M, Heim M A, Weisshaar B, Uhrig J F (2004):** Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. In: *Plant J* 40 (1), S. 22–34.
- Zlatanova J, Thakar A (2008):** H2A.Z: view from the top. In: *Structure* 16 (2), S. 166–179.

- APPENDIX -

A.1 Histonmodifikationsmuster an ausgesuchten Referenzsequenzen für die Normalisierung der CHIP-Daten in reifen und seneszenten Blättern von Arabidopsis WT-Pflanzen.

Zu Beginn der Analysen gab es keine publizierten Daten darüber, welche Referenzgene für CHIP-Analysen in seneszenten Systemen verwendet werden können. Daher wurde ein Set von Genen ausgewählt (Tabelle A.1), die auf ihre Eignung als Referenzsequenzen im seneszenten System hin untersucht werden sollten.

Referenzbezeichnung	Locus	Antikörper				Referenz
		H3K4me2	H3K4me3	H3K9me2	H3K27me3	
<i>TUA4</i>	AT1G04820	+	+	-	-	Zhang et al. 2009
<i>ACTIN</i>	AT3G18780	+	+	-	-	Zhang et al. 2009
<i>180bp SR</i>	-	-	-	+	-	Chawla et al. 2007
<i>MULE</i>	AT2G15810	-	-	+	-	Mathieu et al. 2005
<i>SAG12</i>	AT5G45890	-	-	-	+	Zhang et al. 2007
<i>STM*</i>	AT1G62360	-	-	-	+	Schubert et al. 2006
<i>AG*</i>	AT4G18960	-	-	-	+	Schubert et al. 2006

*Sternchen markieren die Gene, die erst in späteren Analysen für die Untersuchung der H3K27me3-Modifikation hinzugezogen wurden. Mit (+) gekennzeichnet sind die Modifikationen für die angegebenen Referenzbereiche ausgewählt wurden.

Die möglichen Referenz-DNA-Bereiche wurden dafür über CHIP analysiert. In Abbildung A-1 sind die erhaltenen gemittelten %-Inputwerte (%I) der sechs biologischen Replikate für die getesteten Referenzgene *TUA4* (*TUBULIN ALPHA-4*), das transposable Element *MULE* (AT2G15810) und *SAG12* (AT5G45890) sowie des *180bp single repeats* (*180bp SR*) der CHIP-Analysen mit den vier ausgewählten Histonmethylierungsmarks H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 sowie H3K27me3 für die zwei untersuchten Entwicklungsstadien gezeigt. Für *TUA4* wurde zum einen eine Promotorregion (*TUA-I*) von -398bp bis -248bp und zum anderen eine kodierende Sequenz von +827bp bis +938bp, jeweils in Relation zum ATG-Kodon (*TUA4-II*; kodierende Sequenz; Exon 2), analysiert. *TUA4* sollte als Referenz für die H3K4me2 und H3K4me3-Modifikationen dienen. *MULE* sowie das *180bp SR* sind perizentromer in heterochromatischen Chromatinbereichen lokalisiert und sollten als Referenzsequenzen für die heterochromatinspezifische H3K9me2-Modifikation dienen. Zudem wurde *SAG12* als Referenzgen für die Trimethylierung an H3K27 verwendet, da dieses Gen in Keimlingen laut dem *UCSC Arabidopsis Genome Browser* mit dieser Modifikation assoziiert vorliegen sollte (Zhang et al. 2007). Wie in Abbildung A-1A ersichtlich, wurden mit den Antikörpern gegen die euchromatischen Histonmethylierungsmodifikationen H3K4me2 und H3K4me3 im Verhältnis zu den anderen Referenz-DNA-Regionen vermehrt die des *TUA4* Gens präzipitiert. Dies spricht für eine Assoziation des *TUA4*-Gens an den untersuchten Regionen mit Histonen, die die euchromatischen Marks H3K4me2 und H3K4me3 tragen. Für die H3K4me2-Modifikation wurde für beide untersuchten Regionen in NS und S1 etwa gleich viel DNA präzipitiert. Im Gegensatz dazu ist die H3K4me3-Modifikation nur in der Region II des *TUA4*-Gens (kodierende Sequenz) im S1-Stadium stabil, wohingegen es zu einem signifikanten Verlust der Modifikation an der untersuchten Promotorregion I (*TUA-I*) kommt. Da insbesondere die Trimethylierung von H3K4 an transkriptionsaktivem Chromatin zu finden ist, wurde die Expression des Tubulins in den beiden untersuchten Stadien NS und S1 analysiert (Abbildung A-2). Dabei zeigte sich, dass die Expression im S1-Stadium signifikant verringert ist, was mit der Abnahme der H3K4 Trimethylierung an *TUA4-I* korreliert. Im Gegensatz zu *TUA4* konnten sowohl im NS- als auch im S1-Stadium erwartungsgemäß nur sehr geringe Mengen DNA für das *180bp SR* und *MULE* über die H3K4me2- und H3K4me3-Antikörper präzipitiert werden (Abb. A-1A). Auch für *SAG12* konnte nur sehr wenig DNA aus Chromatin nicht seneszenten Blätter (NS-Stadium) für die beiden Histonmarks präzipitiert werden. Interessanterweise kommt es für die Trimethylierung an H3K4 jedoch während der Seneszenz zu einem

signifikanten Anstieg an *SAG12*. In Abbildung A-1B sind die %-Inputwerte (%I) der gemittelten sechs biologischen Replikate für die Dimethylierung an H3K9 und die Trimethylierung an H3K27me3 gezeigt.

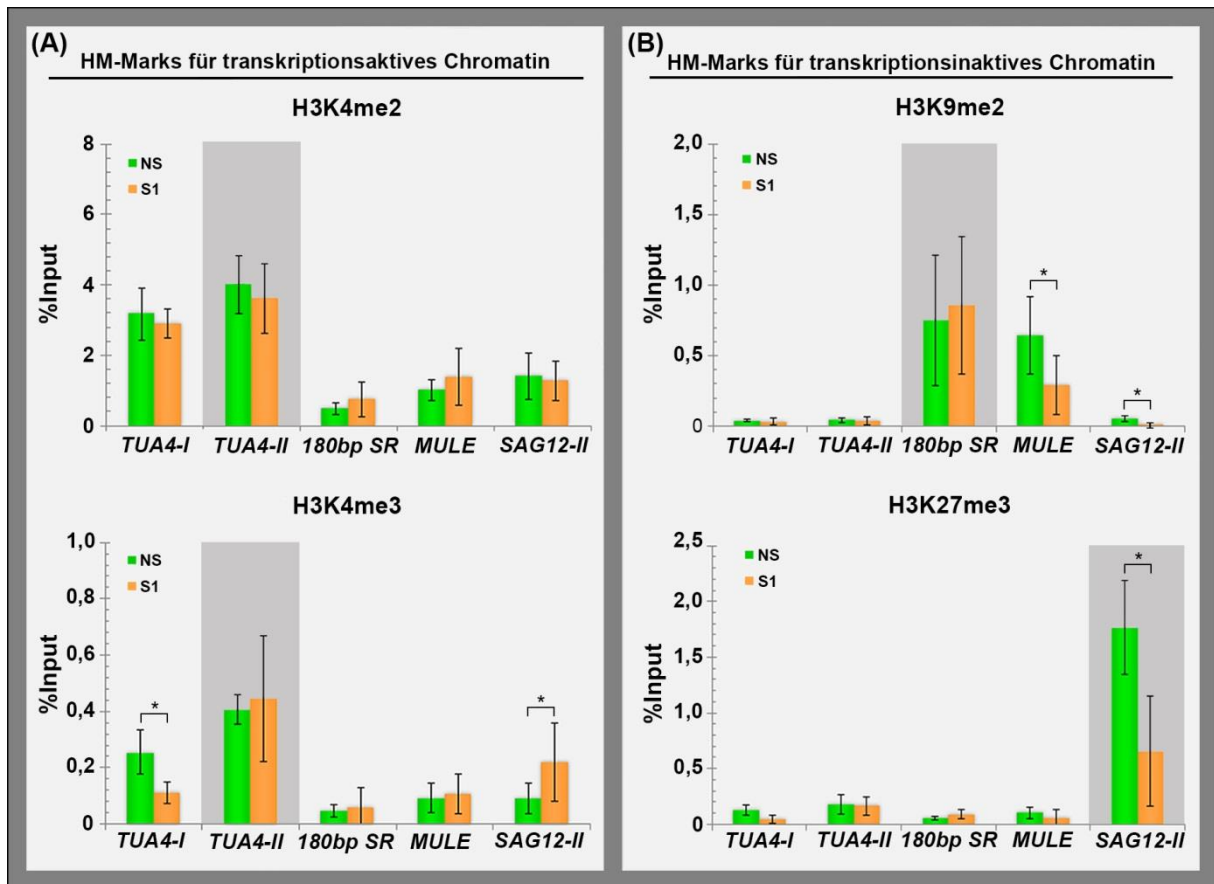


Abbildung A-1: ChIP-Analysen für die Auswahl von putativen Referenz-DNA-Bereichen. Dargestellt sind die %-Inputwerte (%Input) der Immunpräzipitation für *TUA4*, *180bp SR*, *MULE* und *SAG12* (A) über Antikörper gegen H3K4me2 und H3K4me3 bzw. (B) H3K9me2 und H3K27me3 für Chromatinextrakte aus nicht seneszenten (NS) und seneszenten (S1) Blättern. Jeder Datenpunkt beruht auf 6 unabhängigen Experimenten. Grüne Balken repräsentieren die Daten, die für das NS-Stadium erhalten wurden. Orange Balken repräsentieren die Daten, die für das S1-Stadium erhalten wurden. Die immunpräzipitierten und über qPCR quantifizierten Mengen für die einzelnen untersuchten DNA-Bereiche wurden auf die entsprechende DNA-Menge des Ausgangsmaterials bezogen. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$). Die für die Normalisierung der SAG-ChIP-Daten verwendete Region ist jeweils grau hinterlegt.

Die stärkste Markierung mit der repressiven heterochromatischen Modifikation H3K9me2 wurde erwartungsgemäß am *180bp SR* sowie am *MULE*-Transposon detektiert. Während die Assoziation des *180bp SR*s relativ unverändert zwischen NS und S1 bleibt, kommt es zu einem signifikanten Verlust der H3K9me2-Modifikation an *MULE*. Für die übrigen Gene *SAG12* und *TUA4* konnte mit dem Antikörper gegen H3K9me2 kaum DNA präzipitiert werden. Dennoch wurde ein deutlicher Abfall der H3K9me2-Modifikation an *SAG12* im S1-Stadium im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

Da sowohl die Di- als auch die Trimethylierung von H3K4 an der untersuchten *TUA4-II*-Region keine Unterschiede zwischen den beiden Entwicklungsstadien aufwies, wurde diese Region als Referenzgenbereich zur Normalisierung für die zu analysierenden Zielgene verwendet. Das *180bp SR* wurde für die Normalisierung der ChIP-Zielgendaten, die für den H3K9me2-Mark erhalten wurden, ausgewählt (die für die Normalisierung der IP-Daten ausgewählten Referenzgene bzw. DNA-Bereiche sind in Abbildung A-1A und A-1B für jede Histonmodifikation grau hinterlegt). Dabei erfolgte die Normalisierung der %-Inputwerte der Zielgene eines Entwicklungsstadiums für jedes biologische Replikat auf die entsprechenden %-Inputwerte der ausgewählten Referenz-DNA-Sequenz. Für die H3K27me3-Immunpräzipitationen zeigte sich eindeutig eine Anreicherung der H3K27me3-Modifikation an *SAG12* im Verhältnis zu allen anderen Genen (Abb. A-1B). So wurden nur sehr geringe DNA-Mengen für *TUA4*, *MULE* und das *180bp SR* über den H3K27me3-Antikörper präzipitiert.

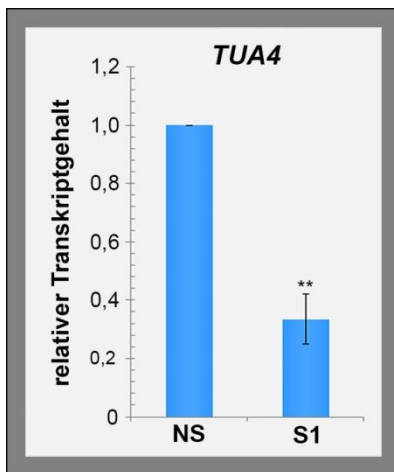


Abbildung A-2: Bestimmung der relativen Expression von TUA4 während der Seneszenz. Bestimmung der relativen Transkriptgehalte mittels qRT-PCR in dem definierten Seneszenzstadium S1, bezogen auf die basalen Transkriptgehalte in der nicht seneszenten Kontrolle (NS), die gleich eins gesetzt wurden. Die Analyse der Daten erfolgte in Bezug auf das Referenztranskript der 18S rRNA anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. Kapitel V.2.5.7.3). Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede (zweiseitiger Student *t*-Test) sind durch Sternchen markiert $p < 0,01$ (**).

Dies zeigt zum einen die Spezifität des Antikörpers, da in den *USCS Arabidopsis Genome Browser* veröffentlichten Daten zwar für *SAG12* jedoch nicht für *TUA4*, *MULE* oder das *180bp SR* eine Assoziation mit trimethyliertem H3K27 gezeigt wurde. Zum anderen ist so die Annahme bestätigt, dass *SAG12* nicht nur in Keimlingen, sondern auch in ausdifferenzierten Blättern mit H3K27me3 assoziiert vorliegt. Abbildung A-1B zeigt allerdings auch, dass es zu einem deutlichen Abfall von H3K27me3 im S1-Stadium an der untersuchten Region von *SAG12* kommt. Die Normalisierung der H3K27me3-ChIP-Daten für die Zielgene erfolgte dennoch auf die *SAG12-II*-Region. Da allerdings die Markierung nicht stabil über die Seneszenz war, ist *SAG12* nicht optimal geeignet für die Normalisierung der ChIP-Zielgendaten. Daher wurden in späteren ChIP-Ansätzen zusätzlich, die bereits publizierten H3K27me3-Zielsequenzen *AG* und *STM* (*AGAMOUS* und *SHOOT MERISTEMLESS*) zusammen mit *SAG12* untersucht. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Replikaten sind in Abbildung A-3 zusammengefasst.

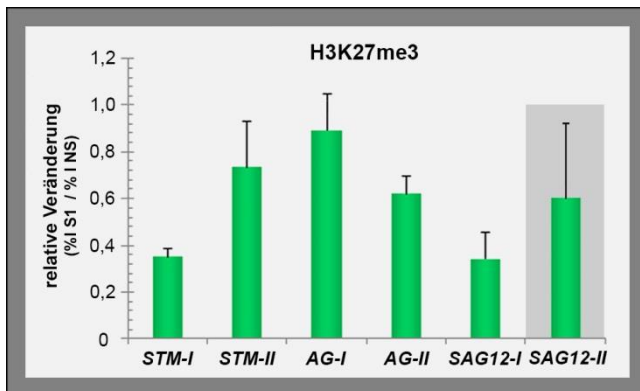


Abbildung A-3: Relative Veränderungen von H3K27me3 an Referenzgenen für den WT während der Seneszenz. Abgebildet sind die Ergebnisse der ChIP-Analysen für die zwei untersuchten Stadien (NS und S1), die unter Verwendung des Antikörpers gegen die Histonmodifikation H3K27me3 erfolgten. Die Balken ergeben sich dabei aus dem Quotienten der %-Inputwerte des S1-Stadiums (%I S1) bezogen auf die des NS-Stadiums (%I NS). Jeder Datenpunkt beruht auf drei biologisch unabhängigen Experimenten (entsprechende Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung). Die für die Normalisierung der SAG-ChIP-Daten verwendete Region *SAG12-II* ist grau hinterlegt.

Sowohl für *AG* als auch *STM* konnten deutliche Level an H3K27me3, vergleichbar mit denen an *SAG12*, in NS detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich, dass es in Abhängigkeit von den untersuchten Bereichen der Gene, ebenfalls zu einem mehr oder weniger starken Verlust der H3K27me3-Modifikation im S1-Stadium im Vergleich zum NS-Stadium kommt. Die einzige Genregion, die stabil mit H3K27me3 markiert ist, war die *AG-I*-Region (Promotor; -1460 bis -1299bp *upstream* des Translationsstarts). Auf Grund des Rückgangs der H3K27me3-Markierung an den untersuchten Genen, wurde die Expression von *AG* und *STM* im NS- und S1-Stadium überprüft. Für beide Gene konnte in beiden Stadien nur eine sehr geringe Transkriptmenge nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *STM*, weist *AG* eine leichte Erhöhung des gemessenen Transkriptgehalts im S1-Stadium im Verhältnis zur NS-Kontrolle auf (Daten nicht gezeigt). Für die durchgeführten ChIP-Analysen an den Zielgenen, konnte die Normalisierung auf die *AG-I*-Region nicht erfolgen, da die Analysen der *STM* und *AG*-Regionen erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Arbeit erfolgten und so nicht parallel mit den ChIP-Experimenten an den SAGs durchgeführt wurden. Daher erfolgte die Normalisierung der %-Inputwerte beider

Stadien des Zielgens für die H3K27me3 immunopräzipitierte DNA auf die %-Inputwerte von *SAG12-II* von nicht seneszenten (NS) Blättern. Dennoch sollte in zukünftigen Untersuchungen bezüglich der biologischen Bedeutung der Trimethylierung von H3K27 an SAGs, die *AG-I*-Region sowie weitere putative Referenzgene mit untersucht werden.

A.2 Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern im WT.

Neben den bereits erwähnten IPs mit spezifischen Antikörpern gegen N-terminale Histonmethylierungen an Histon H3, erfolgte immer parallel eine IP mit einem Antikörper gegen den nichtmodifizierten C-terminalen Teil von H3 (s. Kapitel III.3.1). Die Ergebnisse der Immunopräzipitation mit dem H3C-Antikörper für die vier zu untersuchenden SAGs sowie aller verwendeter Referenz-DNA-Regionen sind in Abbildung A-4 dargestellt. Gezeigt sind hier jeweils die relativen Veränderungen der präzipitierten DNA-Menge aus Chromatinextrakten des S1-Stadiums im Verhältnis zur DNA-Menge aus Chromatin des NS-Stadiums, die 100% gesetzt wurde. Für alle untersuchten Loci wurden keine signifikanten Unterschiede in der Nukleosomendichte bei beiden Entwicklungsstadien festgestellt. Ob die bei einigen Proben zu beobachtenden leichten Schwankungen eine Bedeutung haben, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

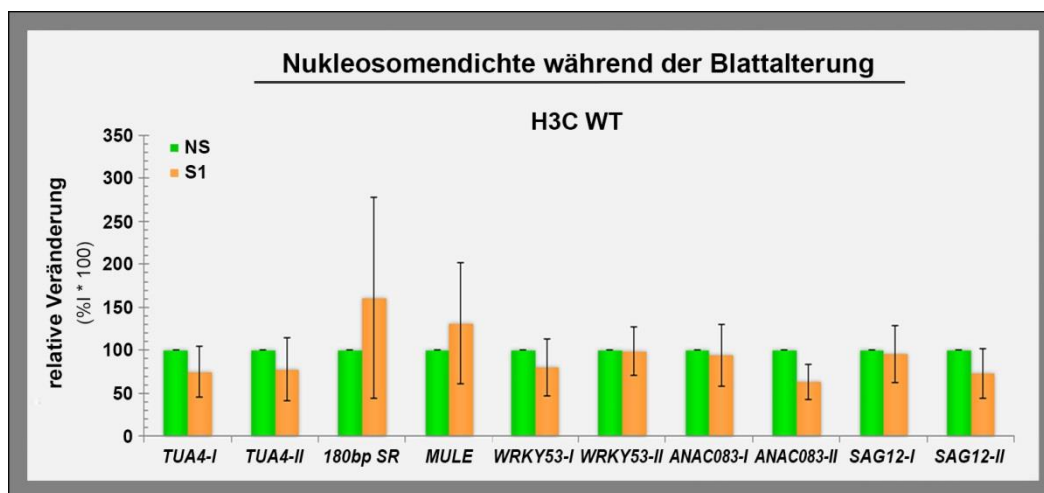


Abbildung A-4: Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern von *Arabidopsis* im WT. Gezeigt sind die relativen Veränderungen der %-Inputwerte (%I) für alle Marker- und Zielgene, die durch Immunopräzipitation mittels Antikörpern gegen den nichtmodifizierten C-terminalen Teil des Histon H3 (H3C) für Chromatinextrakte aus Blättern des S1-Stadiums (orange Balken) gewonnen wurden, bezogen auf die des nicht seneszenten Stadiums (NS, grüne Balken), die 100% gesetzt wurden. Jeder Datenpunkt zeigt das arithmetische Mittel von vier unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung (dünne schwarze Fehlerbalken).

A.3 Histonmodifikationsmuster an Markergenen für die Normalisierung der ChIP-Daten während der Seneszenz für die *SUVH2-oe*-Linie.

Zu Beginn der Analysen für diese Arbeit erfolgte die Suche nach geeigneten Referenzgenen oder DNA-Bereichen, die stabil mit einer entsprechenden Modifikation in den zu vergleichenden Proben markiert sind (Kapitel VI.3.1.1 sowie Appendix A.1). Für die *SUVH2-oe*-Linie wurde nun ebenfalls überprüft ob sich die Referenz-DNA-Bereiche für die Normalisierung der ChIP-Daten der Zielgene eignen. In Abbildung A-5 sind die Ergebnisse der ChIP-Ansätze für die *SUVH2-oe*-Linie aller ausgewählten Referenz-DNA-Regionen gezeigt. Insgesamt ergaben die Untersuchungen für die H3K4me2, H3K4me3 und die H3K9me2-IPs kaum Unterschiede für die untersuchten Referenz-DNA-Bereiche im Vergleich zum WT (Abb. A-1B). Für die *SAG12-II*-Region, für die im WT ein Verlust der H3K27me3-Modifikation während der Seneszenz gezeigt wurde, konnte ein signifikanter Anstieg, der präzipitierten DNA-Menge im S1-Stadium nachgewiesen werden. Dabei sind die %I der H3K27me3-IP im NS-Stadium (Abb. A-5B) in etwa mit denen des NS-Stadiums des WTs vergleichbar (Abb. A-1B). Darüber hinaus kommt es auch am *TUA4*-Gen zu einem signifikanten Anstieg der H3K27me3-Modifikation.

werden (Abb. A-1B). Hier konnte für den WT kaum ein Vorkommen dieses Marks mit den untersuchten Bereichen nachgewiesen

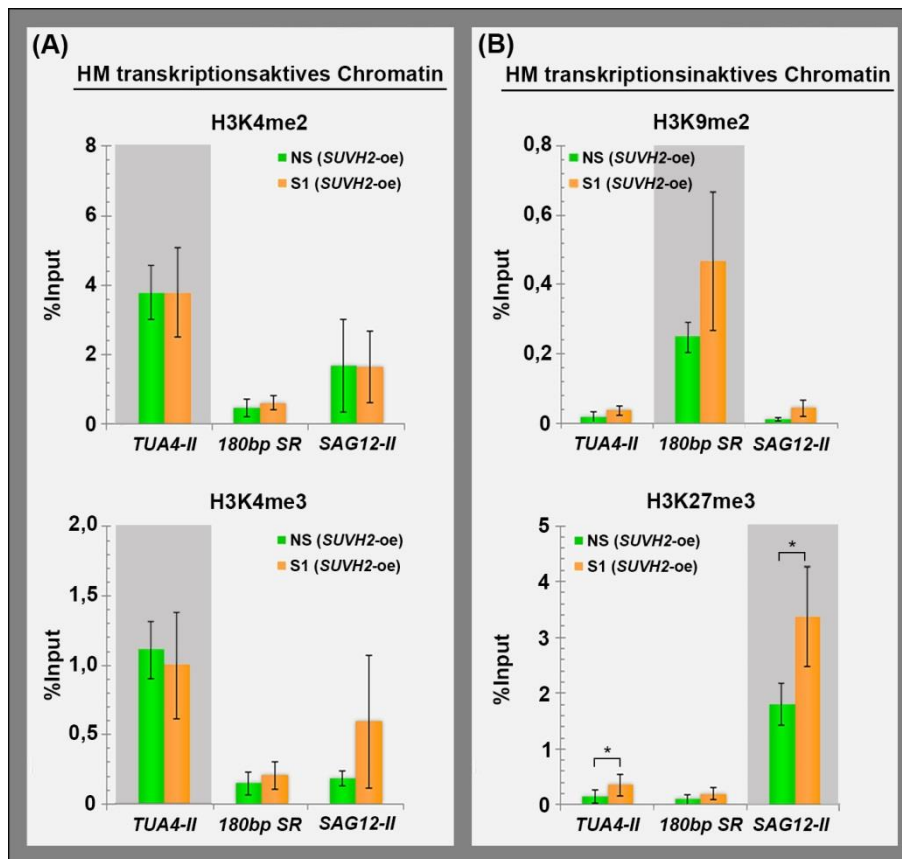


Abbildung A-5: ChIP-Analysen der Referenz-DNA-Regionen in der SUVH2-oe-Linie. Dargestellt sind die %-Inputwerte (%Input) der Immunpräzipitation für *TUA4-II*, *180bp SR* und *SAG12-II* (A) über Antikörper gegen H3K4me2 und H3K4me3 bzw. (B) H3K9me2 und H3K27me3 für Chromatinextrakte aus nicht seneszenten (NS) und seneszenten (S1) Blättern der SUVH2-oe-Linie. Jeder Datenpunkt beruht auf 6 unabhängigen Experimenten. Grüne Balken repräsentieren die Daten, die für das NS-Stadium erhalten wurden. Orange Balken repräsentieren die Daten, die für das S1-Stadium erhalten wurden. Die schwarzen Fehlerbalken repräsentieren die entsprechenden Standardabweichungen. Die immunpräzipitierten und über qPCR quantifizierte Mengen für die einzelnen untersuchten DNA-Bereiche wurden auf die entsprechende DNA-Menge des Ausgangsmaterials bezogen. Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger Student *t*-Test; * = $p < 0,05$). Die für die Normalisierung der SAG-ChIP-Daten verwendete Region ist jeweils grau hinterlegt.

A.4 Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern der SUVH2-oe-Linie.

Die Ergebnisse der IP mit dem H3C-Antikörper für die SUVH2-oe-Linie sind für die vier zu untersuchenden SAGs sowie alle verwendeten Referenz-DNA-Regionen in Abbildung A-6A dargestellt. Gezeigt sind hier die Veränderungen der präzipitierten DNA-Menge aus Chromatinextrakten des S1-Stadiums im Verhältnis zur DNA-Menge aus Chromatin des NS-Stadiums, das 100% gesetzt wurde. Für die meisten der untersuchten Loci wurden keine signifikanten Veränderungen der Nukleosomendichte festgestellt. Allerdings zeigen der *TUA4-II* Bereich, die Region I von *WRKY53* sowie die Region I und II von *ANAC083* eine signifikante Zunahme der %-Inputmenge, die im S1-Stadium im Vergleich zum NS-Stadium präzipitiert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der korrespondierenden Untersuchungen für den WT sind jeweils die relativen präzipitierten DNA-Mengen für die SUVH2-oe-Linie und des WT in Form einer Ratio (S1/NS) in Abbildung A-6B gezeigt. Aus dieser Darstellung ist klar ersichtlich, dass es in der *TUA4-II*- sowie der *ANAC083-II*-Region zwar zu einem signifikanten, jedoch relativ geringem Anstieg im Vergleich zum WT kommt. Im Gegensatz dazu kommt es in den Regionen *WRKY53-I* und *ANAC083-I* in etwa zu einer Verdopplung, der durch den H3C-Antikörper präzipitierten DNA-Menge aus seneszentem als aus nicht seneszentem Blattgewebe. Im WT konnte an diesen Regionen keine Veränderungen während der Seneszenz festgestellt werden.

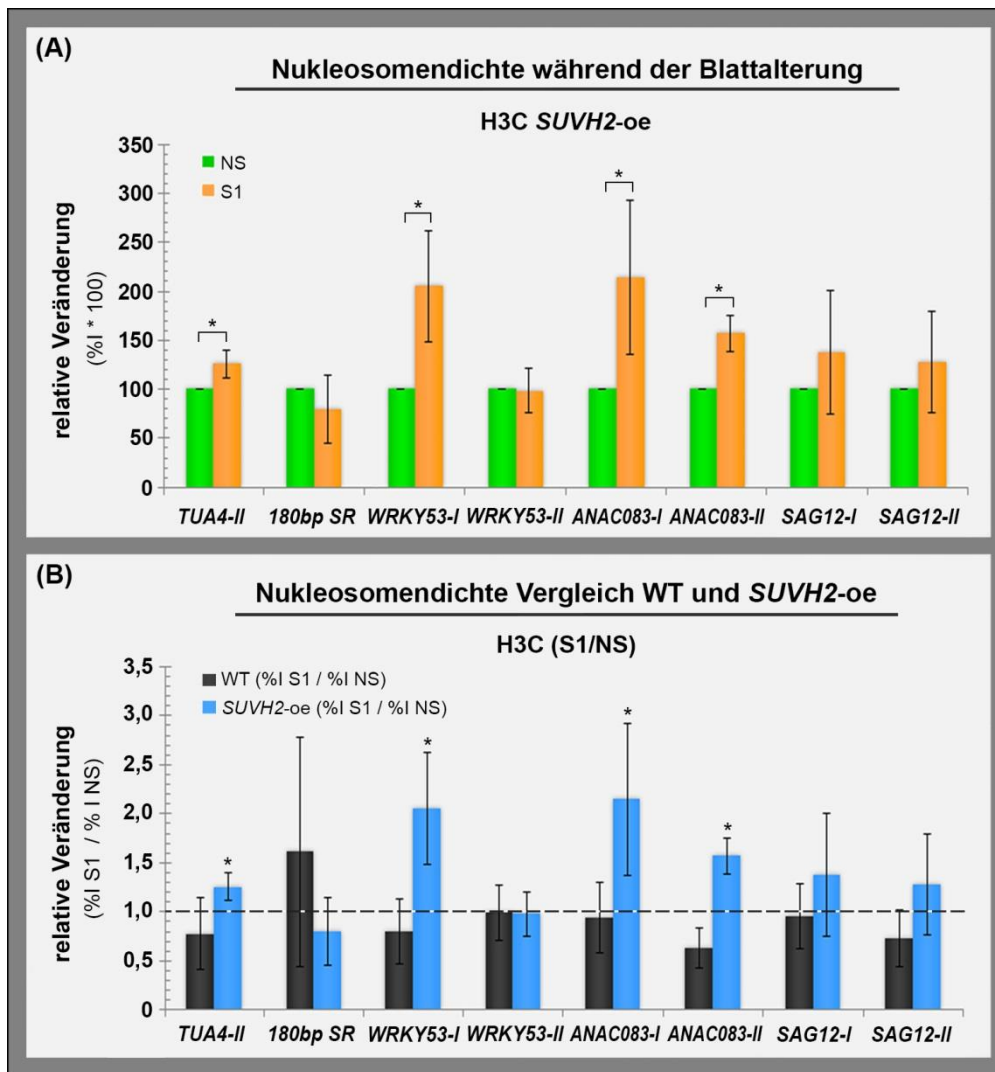


Abbildung A-6: Bestimmung der Nukleosomendichte in reifen und seneszenten Blättern der *SUVH2-oe*-Linie und des WT. (A) Gezeigt sind die Veränderungen der %-Inputwerte (%) für alle Marker- und Zielgene, die durch Immunopräzipitation mittels Antikörper gegen den nichtmodifizierten C-terminalen Teil des Histon H3 (H3C) für Chromatinextrakte aus Blättern der *SUVH2-oe*-Linie des S1-Stadiums (orange Balken) gewonnen wurden, bezogen auf die des nicht seneszenten Stadiums (NS, grüne Balken), die 100% gesetzt wurden. (B) Gezeigt ist der Vergleich der relativen Veränderungen der %I der H3C-IPs für die *SUVH2-oe*-Linie (blaue Balken) und dem WT (schwarze Balken). Dabei wurden die %I einer Linie des S1-Stadiums auf die %I einer Linie des NS-Stadiums bezogen. Jeder Datenpunkt zeigt das arithmetische Mittel von vier unabhängigen Experimenten mit entsprechender Standardabweichung (dünne schwarze Fehlerbalken). Sternchen (*) kennzeichnen signifikante Unterschiede (zweiseitiger *Student t*-Test; * = $p < 0,05$).

A.5 H3K27me3-ChIP-seq Ergebnisse für die *SAG12*-Genregion (Brusslan et al. 2012).

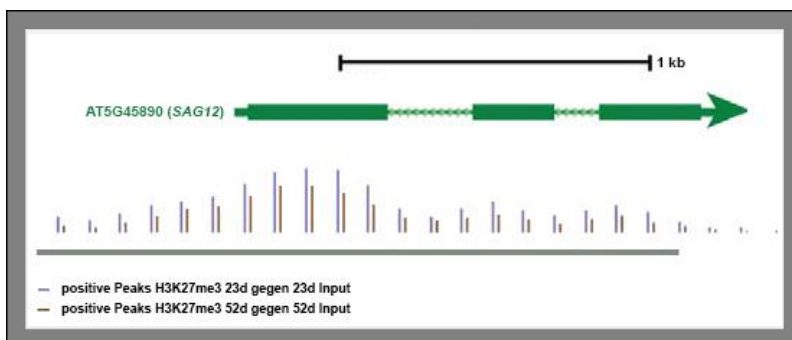


Abbildung A-7: Ergebnisse der genomweiten H3K27me3-ChIP-seq-Analysen für die *SAG12*-Genregion von Brusslan et al. (2012). Die H3K27me3-Modifikation ist in nicht seneszenten Blättern vorhanden (23 Tage Probe; d, days; lila Linien), zeigt aber nur einen leichten, jedoch nicht signifikanten Abfall in seneszenten Blättern (52 Tage Probe; d, days; lila Linien).

A.6 DNA-Methylierungsprofile an Kontrollsequenzen der Bisulfidsequenzierungsanalysen.

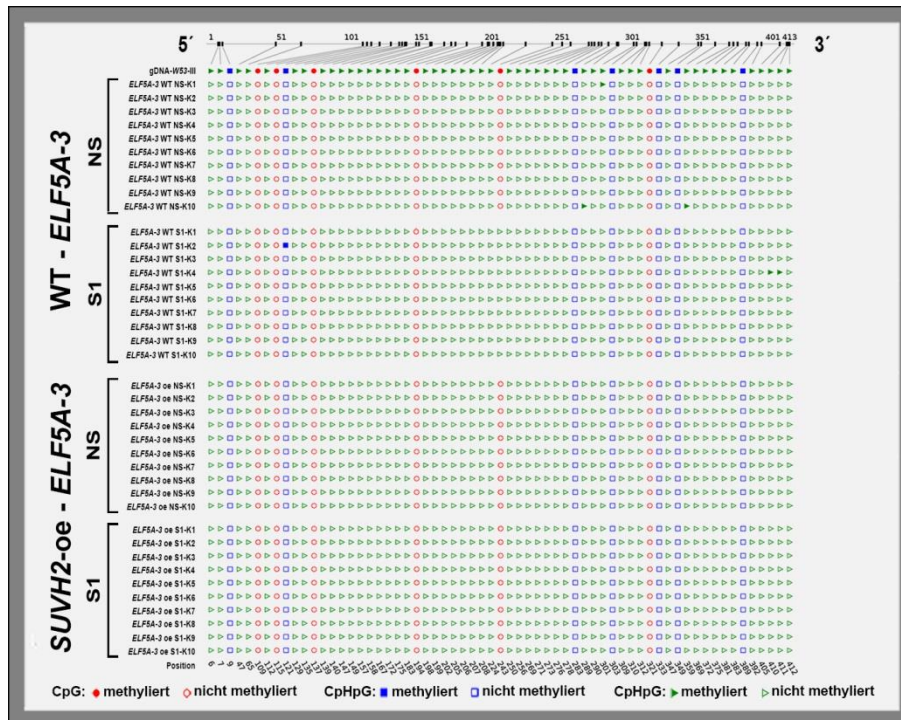


Abbildung A-8: DNA-Methylierungsprofile von *ELF5A-3* im WT und *SUVH2-oe* an reifem und seneszentem Blattmaterial. Gezeigt sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für beide untersuchten Stadien (NS und S1) an *ELF5A-3* (AT1G69410), die mittels Bisulfidsequenzierung erfolgten. Gezeigt sind die durch CyMATE[®] generierten Bilder für ein *ELF5A3*-Fragment, in denen die ausgefüllten Symbole Cytosinmethylierung und die ungefüllten Symbole nicht methylierte Cytosine kennzeichnen. Dabei ist der Kontext der einzelnen Cytosine unterschieden durch rote Kreise (symmetrische Methylierung im CpG Kontext), blaue Vierecke (symmetrische Methylierung im CpHpG Kontext; H = A, C, T) und grüne Dreiecke (asymmetrische Methylierung im CpHpH Kontext). Auf der linken Seite ist jeweils die Reihenfolge der individuellen Sequenzen der Klone aufgelistet. Es sind beispielhaft jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung für den WT und die *SUVH2-oe*-Linie von zehn individuellen Klonen für jedes Entwicklungsstadium gezeigt.

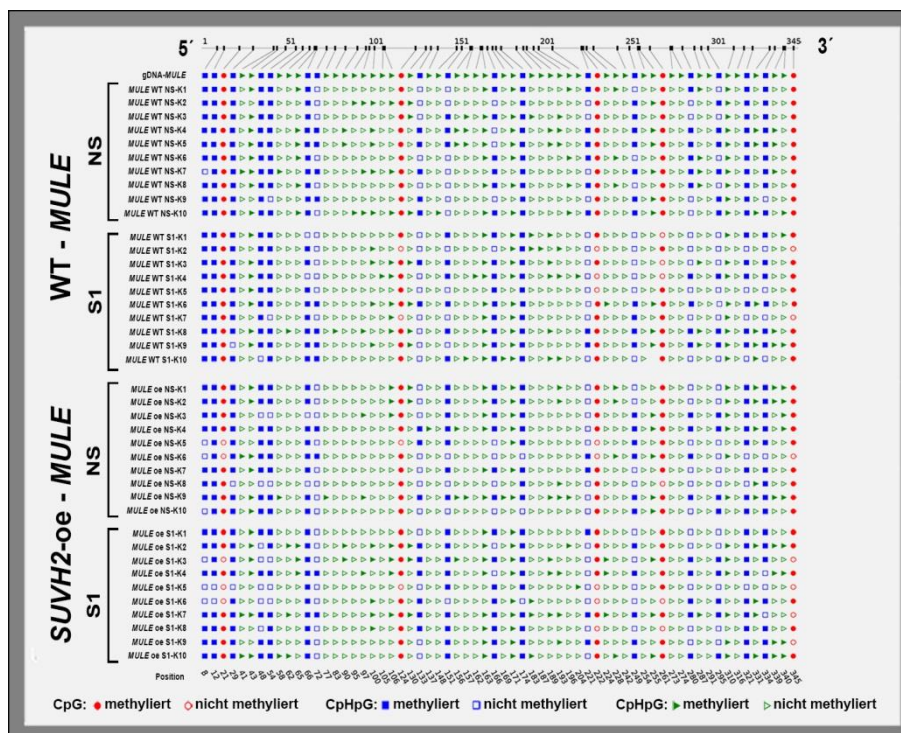


Abbildung A-9: DNA-Methylierungsprofile von *MULE* im WT und *SUVH2-oe* an reifem und seneszentem Blattmaterial. Gezeigt sind die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für beide untersuchten Stadien (NS und S1) an *MULE* (AT2G15810), die mittels Bisulfidsequenzierung erfolgten. Gezeigt sind die durch CyMATE[®] generierten Bilder für ein *MULE*-Fragment, in denen die ausgefüllten Symbole Cytosinmethylierung und die ungefüllten Symbole nicht methylierte Cytosine kennzeichnen. Dabei ist der Kontext der einzelnen Cytosine unterschieden durch rote Kreise (symmetrische Methylierung im CpG Kontext), blaue Vierecke (symmetrische Methylierung im CpHpG Kontext; H = A, C, T) und grüne Dreiecke (asymmetrische Methylierung im CpHpH Kontext). Auf der linken Seite ist jeweils die Reihenfolge der individuellen Sequenzen der Klone aufgelistet. Es sind beispielhaft jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung für den WT und die *SUVH2-oe*-Linie von zehn individuellen Klonen für jedes Entwicklungsstadium gezeigt.

A.7 Auflistung aller im WT und/oder in der *SUVH2*-oe-Linie als differentiell reguliert definierten Gene der *Expressionsprofiling*-Untersuchungen der qRT-PCR-Plattformdaten.

Tab. A.2 Gegenüberstellung aller im WT und/oder in der <i>SUVH2</i> -oe-Linie differentiell regulierten Gene der TF-Plattformanalysen.					
Familie	WT induziert	<i>SUVH2</i> -oe induziert	Familie	WT reprimiert	<i>SUVH2</i> -oe reprimiert
NAC	AT1G01010	AT1G01010	Aux/IAA	AT1G15580	-
GIF	AT1G01160	AT1G01060	bHLH	AT1G18400	-
bHLH	AT1G01260	-	AP2/EREBP	AT1G21910	-
MYB-related	-	AT1G01520	bHLH	AT1G31050	-
NAC	AT1G01720	AT1G01720	AP2/EREBP	-	AT1G44830
NAC	AT1G02220	AT1G02220	C2C2(Zn) DOF	AT1G47655	-
bHLH	AT1G02340	AT1G02340	MADS	AT1G47760	-
Aux/IAA	AT1G04100	-	MYB	AT1G49010	-
C2H2	AT1G04445	-	MADS	AT1G54760	-
TRAF	AT1G05690	AT1G05690	NAC	-	AT1G62700
MYB	AT1G06180	-	bHLH	AT1G73830	-
GRAS	AT1G07520	-	C2H2	AT1G75710	-
GRAS	AT1G07530	-	AP2/EREBP	AT1G79700	-
C2C2(Zn) DOF	AT1G07640	-	C2H2	AT1G80730	-
AS2 (LOB) I	AT1G07900	AT1G07900	HB	AT2G02540	-
C2H2	AT1G08290	-	CCAAT-HAP3	AT2G13570	-
AP2-EREB	-	AT1G13260	C2C2(Zn) GATA	AT2G18380	-
AP2-EREB	-	AT1G16060	Aux/IAA	AT2G22670	-
AS2 (LOB) I	AT1G16530	AT1G16530	MYB	AT2G22710	-
Tify	AT1G17380	AT1G17380	MYB-related	AT2G30420	-
MYB-related	AT1G17460	AT1G17460	LIM	AT2G39900	-
CCAAT-HAP2	AT1G17590	-	bZIP	AT2G42380	AT2G42380
MYB	AT1G18570	AT1G18570	C2C2(Zn) GATA	AT2G45050	-
MYB	AT1G18710	AT1G18710	MYB	-	AT3G01140
AP2/EREBP	AT1G19210	-	E2F/DP	AT3G01330	-
bZIP	AT1G19490	AT1G19490	CPP(Zn)	AT3G04850	-
MYB	AT1G19510	-	bHLH	AT3G07340	-
HB	AT1G19700	-	HB	AT3G18010	AT3G18010
HMG	AT1G20693	AT1G20693	ABI3/VP1	AT3G18960	-
PLATZ	AT1G21000	AT1G21000			AT3G22760
GRAS	AT1G21450	AT1G21450	Aux/IAA	AT3G23050	-
bZIP	AT1G22070	AT1G22070	C2C2(Zn) DOF	AT3G45610	-
MYB	AT1G22640	AT1G22640	E2F/DP	AT3G48160	-
AP2/EREBP	AT1G22985	AT1G22985	C2C2(Zn) GATA	AT3G51080	-
PERK (rec Kinase)	AT1G23540	AT1G23540	SBP	AT3G57920	-
C2H2	AT1G24625	-	bZIP	AT3G58120	AT3G58120
GARP-G2-like	-	AT1G25550	AP2/EREBP	AT3G60490	-
NAC	AT1G25580	-	C2C2(Zn) GATA	AT3G60530	-
AP2/EREBP	AT1G28360	AT1G28360	bHLH	AT3G61950	AT3G61950
AP2/EREBP	AT1G28370	AT1G28370	AS2 (LOB) I	-	AT4G00220
WRKY	AT1G29280	AT1G29280	bHLH	AT4G01460	-
WRKY	AT1G29860	AT1G29860	ABI3/VP1	AT4G01580	-
Tify	AT1G30135	AT1G30135	MYB	AT4G01680	-
CCAAT-HAP2	AT1G30500	AT1G30500	AP2/EREBP	AT4G11140	AT4G11140
NAC	AT1G32870	AT1G32870	CPP(Zn)	-	AT4G14770
NAC	AT1G34180	AT1G34180	C2H2	AT4G16610	AT4G16610
TCP	AT1G35560	AT1G35560	HMG	AT4G23800	-
bZIP	AT1G42990	-	MADS	AT4G24540	-
bHLH	AT1G43770	-	ULT	AT4G28190	AT4G28190
C2H2	AT1G43860	-	bHLH	AT4G30180	AT4G30180
GeBP	AT1G44810	-	SET-domain	AT4G30860	AT4G30860
AP2/EREBP	AT1G46768	-	AP2/EREBP	AT4G32800	-
MYB	AT1G48000	AT1G48000	bHLH	AT4G36540	-
bZIP	AT1G49720	-	C2H2	AT5G03510	-
GRAS	AT1G50420	-	ABI3/VP1	AT5G06250	-
NAC	AT1G52880	AT1G52880	AP2/EREBP	AT5G10510	-
NAC	AT1G52890	AT1G52890	AP2/EREBP	-	AT5G11190
SBP	-	AT1G53160	MYB	AT5G11510	AT5G11510
AP2/EREBP	AT1G53910	-	AP2/EREBP	AT5G11590	-
CCAAT-HAP2	AT1G54160	AT1G54160	MADS	AT5G13790	-
C2H2	AT1G55110	-	GeBP	AT5G14280	-
GRAS	-	AT1G55580	MYB	AT5G15310	-
NAC	AT1G56010	AT1G56010	NAC	AT5G17260	-
CCAAT-HAP5	AT1G56170	AT1G56170	SET-domain	-	AT5G24330
MYB	AT1G56650	AT1G56650	AP2/EREBP	AT5G25190	-
bHLH	AT1G59640	AT1G59640	C2C2(Zn) GATA	AT5G25830	-
bHLH	-	AT1G62975	MYB-related	-	AT5G37260
WRKY	AT1G66600	AT1G66600	C2H2	AT5G39550	-
CAMTA	AT1G67310	-	bHLH	AT5G39860	-
HSF	AT1G67970	AT1G67970	bHLH	AT5G46690	AT5G46690
C3H	AT1G68200	-	HB	AT5G46880	-
GARP-G2-like	-	AT1G68670	MYB	AT5G49330	AT5G49330
WRKY	AT1G69310	AT1G69310	bHLH	AT5G50915	-
MADS	AT1G69540	AT1G69540	bHLH	AT5G51790	-
C2C2(Zn) DOF	AT1G69570	AT1G69570	AP2/EREBP	AT5G57390	-
WRKY	AT1G69810	AT1G69810	ABI3/VP1	AT5G60130	-
HB	-	AT1G70510	C2C2(Zn) DOF	AT5G62940	-
HB	-	AT1G70920	bHLH	AT5G65640	-
AP2/EREBP	AT1G71130	-			
AP2/EREBP	AT1G71520	AT1G71520			
AP2/EREBP	AT1G72360	-			
Tify	AT1G72450	AT1G72450			
CCAAT-HAP2	AT1G72830	AT1G72830			
MYB	-	AT1G74080			
MYB	-	AT1G74430			
MYB	AT1G74650	-			
AP2/EREBP	AT1G74930	-			
bZIP	AT1G75390	AT1G75390			
HB	AT1G75410	AT1G75410			
PLATZ	AT1G76590	AT1G76590			
NAC	AT1G77450	AT1G77450			
HSF	AT1G77570	AT1G77570			
bZIP	AT1G77920	AT1G77920			
C2C2(Zn) CO-like	AT1G78600	-			
Aux/IAA	-	AT1G80390			
WRKY	AT1G80840	-			
			Summe	69	21
			rot	reg	nicht reg
			grün	nicht reg	57
					9

GARP-G2-like	AT2G02060	-
WRKY	AT2G03340	-
MYB	AT2G13960	-
MADS	-	AT2G14210
MYB	AT2G16720	AT2G16720
NAC	AT2G17040	AT2G17040
ZF-HD	AT2G18350	AT2G18350
C3H	AT2G19810	AT2G19810
CPP(Zn)	AT2G20110	-
GARP-G2-like	AT2G20400	AT2G20400
GARP-G2-like	-	AT2G20570
C2C2(Zn) CO-like	-	AT2G21320
CAMTA	AT2G22300	-
HB	AT2G22430	AT2G22430
bHLH	AT2G22760	AT2G22760
bZIP	-	AT2G22850
NAC	AT2G24430	-
WRKY	AT2G25000	AT2G25000
GeBP	AT2G25650	-
HSF	AT2G26150	-
HB	AT2G27220	-
HB	AT2G27990	AT2G27990
bHLH	AT2G28160	-
C2H2	AT2G28200	-
ARF	AT2G28350	-
AS2 (LOB) I	AT2G28500	AT2G28500
C2C2(Zn) DOF	AT2G28510	-
C2H2	AT2G28710	AT2G28710
WRKY	AT2G30250	AT2G30250
C2C2(Zn) CO-like	-	AT2G31380
AP2/EREBP	AT2G33710	-
Tribelix	-	AT2G33550
WRKY	AT2G34830	-
bZIP	AT2G35530	AT2G35550
BPC/BRR	AT2G35550	-
HB	AT2G35940	AT2G35940
ABI3/VP1	AT2G36080	AT2G36080
bZIP	AT2G36270	AT2G36270
GeBP	-	AT2G36340
MYB	AT2G36890	AT2G36890
WRKY	AT2G37260	-
C2H2	AT2G37430	-
Tribelix	AT2G38250	AT2G38250
AP2/EREBP	AT2G38340	AT2G38340
WRKY	AT2G38470	AT2G38470
AP2/EREBP	AT2G40340	AT2G40340
WRKY	AT2G40740	AT2G40740
WRKY	AT2G40750	-
bZIP	AT2G40950	-
bZIP	AT2G41070	-
MYB	-	AT2G42150
NAC	AT2G43000	AT2G43000
bHLH	-	AT2G43010
bHLH	AT2G43140	AT2G43140
RWP-RK	AT2G43500	-
MYB	AT2G44430	-
HB	AT2G44910	AT2G44910
MADS	-	AT2G45660
TCP	AT2G45680	-
bZIP / G box factor 3	AT2G46270	AT2G46270
WRKY	AT2G46400	AT2G46400
MYB-related	AT2G46410	-
HB /ATHB7	AT2G46680	AT2G46680
MYB	AT2G47190	AT2G47190
WRKY	-	AT2G47260
C2C2(Zn) CO-like	AT2G47890	AT2G47890
WRKY58	AT3G01080	AT3G01080
HB	AT3G01220	-
HB	AT3G01470	AT3G01470
WRKY	AT3G01970	AT3G01970
TCP	AT3G02150	AT3G02150
NAC	AT3G04070	AT3G04070
NAC	AT3G04420	AT3G04420
MYB	AT3G05380	-
MYB	AT3G06490	AT3G06490
FHA	AT3G07260	-
MYB	AT3G09370	-
MYB	-	AT3G10113
NAC	AT3G10480	-
NAC	AT3G10490	-
NAC	AT3G10500	AT3G10500
MYB-related	AT3G10590	-
AP2/EREBP	AT3G11020	-
ABI3/VP1	AT3G11580	-
CCAAT-HAP5	-	AT3G12480
GARP-G2-like	AT3G12730	-
C2H2	AT3G13810	AT3G13810
CCAAT-HAP2	AT3G14020	AT3G14020
AP2/EREBP	AT3G15210	-
NAC	AT3G15500	AT3G15500
CAMTA	AT3G16940	-
MYB	AT3G18100	-
TCP	-	AT3G18550
LRR family protein	AT3G19020	AT3G19020
bZIP	AT3G19290	AT3G19290
bHLH	-	AT3G19500
C2H2	AT3G19580	AT3G19580
EIL	AT3G20770	-
CCAAT-HAP2	AT3G20910	AT3G20910
C2C2(Zn) CO-like	AT3G21150	AT3G21150
AP2/EREBP	AT3G23240	AT3G23240
MYB	AT3G23250	AT3G23250
MBF1	AT3G24500	AT3G24500

Trihelix	AT3G25990	AT3G25990
ABI3/VP1	-	AT3G26790
AS2 (LOB) I	AT3G27650	AT3G27650
NAC	AT3G29035	AT3G29035
Tify	AT3G43440	AT3G43440
NAC	AT3G44350	AT3G44350
C2H2	AT3G46080	AT3G46080
C2C2(Zn) DOF	-	AT3G47500
MYB	AT3G47680	-
HB	AT3G49530	-
AP2/EREBP	AT3G50260	AT3G50260
GRAS	AT3G50650	-
HMG	AT3G51880	AT3G51880
bZIP	AT3G51960	AT3G51960
ABI3/VP1	AT3G53310	AT3G53310
C2H2	AT3G53600	AT3G53600
bZIP	AT3G54620	-
MYB	AT3G55730	-
WRKY	AT3G56400	-
MADS	AT3G57390	-
WRKY	AT3G58710	-
HB	AT3G61890	AT3G61890
bHLH	AT3G62090	AT3G62090
GeBP	AT4G00270	-
C3H	AT4G00305	AT4G00305
GeBP	AT4G00390	AT4G00390
GIF	AT4G00850	-
bHLH	AT4G00870	-
C2C2(Zn) DOF	AT4G00940	AT4G00940
MYB-related	AT4G01280	-
HB	AT4G01520	AT4G01520
NAC	AT4G01540	AT4G01540
HB	AT4G01550	AT4G01550
WRKY	AT4G01720	AT4G01720
bZIP	AT4G02640	-
MYB	AT4G05100	AT4G05100
AP2/EREBP	AT4G06746	AT4G06746
bHLH	AT4G09180	-
WRKY	AT4G11070	AT4G11070
C2H2	AT4G12240	-
AP2/EREBP	AT4G13620	-
GARP-ARR-B	AT4G16110	-
CAMTA	AT4G16150	-
bHLH	AT4G16430	-
AP2/EREBP	AT4G16750	-
HB	-	AT4G16780
GRAS	AT4G17230	AT4G17230
AP2/EREBP	AT4G17500	AT4G17500
C2C2(Zn) GATA	AT4G17570	-
GARP-G2-like	AT4G17695	-
PLATZ	AT4G17900	AT4G17900
WRKY	AT4G18170	AT4G18170
HSF	AT4G18880	AT4G18880
ABI3/VP1	AT4G21550	-
MYB	AT4G22680	-
MADS	AT4G22950	AT4G22950
WRKY	AT4G23810	-
AP2/EREBP	AT4G25490	AT4G25490
NAC	AT4G27410	AT4G27410
MYB	-	AT4G28110
NAC	AT4G28530	AT4G28530
bHLH	AT4G28790	AT4G28790
bHLH	AT4G29100	-
ABI3/VP1	AT4G31620	AT4G31620
ABI3/VP1	AT4G31650	-
GARP-ARR-B	AT4G31920	-
ABI3/VP1	AT4G34400	AT4G34000
AP2/EREBP	AT4G34410	AT4G34410
C2C2(Zn) GATA	AT4G34680	AT4G34680
MYB	AT4G34990	AT4G34990
RWP-RK	AT4G35270	-
HMG	AT4G35570	-
GRAS	AT4G36710	-
AP2/EREBP	AT4G36920	-
HSF	AT4G36990	AT4G36990
GARP-G2-like	AT4G37180	AT4G37180
MYB	AT4G37260	-
AS2 (LOB) II	-	AT4G37540
HB	-	AT4G37790
C2C2(Zn) DOF	AT4G38000	-
Trihelix	AT5G01380	AT5G01380
MYB	AT5G02320	-
C2H2	AT5G04340	AT5G04340
C2H2	AT5G04390	-
NAC	AT5G04410	-
MYB	AT5G04760	AT5G04760
C3H	AT5G06420	AT5G06420
CCAAT-HAP2	AT5G06510	AT5G06510
GARP-G2-like	-	AT5G06800
bZIP	AT5G06950	-
bZIP	AT5G06960	AT5G06960
C3H	AT5G07060	-
WRKY	AT5G07100	AT5G07100
C3H	AT5G07500	AT5G07500
NAC	AT5G07680	AT5G07680
MYB	-	AT5G07690
CCAAT-DR1	AT5G08190	-
NAC	AT5G08790	-
bHLH	-	AT5G10570
bZIP	AT5G11260	-
CCAAT-HAP2	AT5G12840	-
NAC083	AT5G13180	AT5G13180
NAC	AT5G14000	AT5G14000

E2F/DP	AT5G14960	AT5G14960	
C2C2(Zn) CO-like	-	AT5G15850	
HSF	AT5G16820	-	
NAC	AT5G18270	AT5G18270	
MADS	AT5G20240	-	
AP2/EREBP	AT5G21960	-	
NAC	AT5G22290	AT5G22290	
NAC	AT5G22380	AT5G22380	
CCAAT-DR1	AT5G23090	-	
MADS	AT5G23260	-	
NAC	AT5G24590	-	
C2H2	-	AT5G25160	
CPP(Zn)	AT5G25790	AT5G25790	
WRKY	AT5G26170	AT5G26170	
C2C2(Zn) GATA	AT5G26930	-	
MYB	AT5G41020	-	
HB	AT5G41410	AT5G41410	
C2H2	AT5G43170	-	
HSF	-	AT5G43840	
WRKY	AT5G46350	AT5G46350	
NAC	-	AT5G46590	
bHLH	AT5G46760	-	
AP2/EREBP	AT5G47230	-	
bZIP	AT5G49450	AT5G49520	
WRKY	AT5G49520	-	
MYB	AT5G49620	AT5G49620	
CCAAT-HAP5	AT5G50480	-	
AP2/EREBP	AT5G51190	-	
MADS	-	AT5G51870	
MYB-related	AT5G52660	-	
C2C2(Zn) CO-like	AT5G54470	AT5G54470	
C2H2	AT5G56200	AT5G56200	
bHLH	AT5G56960	AT5G56960	
bHLH	AT5G57150	AT5G57150	
C2H2	-	AT5G57520	
C3H	AT5G58620	AT5G58620	
HB	-	AT5G59340	
GRAS	AT5G59450	-	
MYB	AT5G59780	AT5G59780	
C2H2	AT5G59820	-	
MADS	AT5G60440	AT5G60440	
ARF	AT5G60450	-	
C2H2	AT5G60470	AT5G60470	
bZIP	-	AT5G60830	
MADS	AT5G60910	AT5G60910	
NAC	AT5G61430	AT5G61430	
AP2/EREBP	AT5G61890	AT5G61890	
MADS	AT5G62165	AT5G62165	
C2C2(Zn) DOF	-	AT5G62430	
NAC	AT5G63790	AT5G63790	
PHD	AT5G63900	-	
NAC	AT5G64530	-	
MADS	AT5G65060	-	
bZIP	AT5G65210	AT5G65210	
C2C2(Zn) GATA	AT5G66320	-	
SRS	AT5G66350	AT5G66350	
C2H2	-	AT5G67450	
AP2/EREBP	AT5G67180	-	
C2H2	AT5G67450	-	
Summe	314	224	
rot	reg	nicht reg	137
grün	nicht reg	reg	47

Auflistung aller differentiell regulierten Gene des TF-Profilings. Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn eine signifikante (p -Wert < 0,05) Veränderung ≥ 4 auftrat ($Fold\ Change = X$ -fache Änderung; $2^{-\Delta\Delta CT} \geq \text{doppelt}$ ($\log_2 \geq 2$) oder $2^{-\Delta\Delta CT} \leq 0,25$ ($\log_2 \leq -2$). Rot markierte Gene sind solche, die nur im WT differentiell reguliert sind. Grün markierte Gene sind solche, die nur in der *SUVH2*-oe-Linie als differentiell reguliert detektiert worden sind. Schwarz markierte Gene sind solche, die sowohl im WT als auch in der *SUVH2*-oe-Linie als differentiell reguliert detektiert worden sind.

A.8 Primersequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer, sortiert nach ihrer experimentellen Funktion aufgeführt. Dabei stehen die folgenden Abkürzungen für: F - *forward* Primer, R - *reverse* Primer sowie LB - *left border* und RB - *right border* einer T-DNA.

Primer für das Überprüfen der Allele in dem Locus von *SUVH2* auf T-DNA-Insertion

AGI-Code	Genbezeichnung	Primerbezeichnung	Sequenz 5' → 3'
AT2G33290	<i>SUVH2</i>	P3.1	ATATGCAGGTGTAGTTGTCACGAG
		P3.2	CCAAAGATATAACAACACTATGATGAG
		P3.3 (GK_left border_o8409)	ATATTGACCATCATACTCATTCG

Primer für das Überprüfen auf gDNA-Kontaminationen

AGI-Code	Genbezeichnung	Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
AT5G65080	<i>AGL68</i>	AT5G65080_gDNA_F*	TTTTTTGCCCCCTTCGAATC
AT5G65080	<i>AGL68</i>	AT5G65080_gDNA_R*	ATCTTCCGCCACCACATTGTAC
AT3G18780	<i>ACT2</i>	ACTIN2_gDNA_F*	CGACTAACGTTGCCTGGATTGAC
AT3G18780	<i>ACT2</i>	ACTIN2_gDNA_R*	CCTTGGATTAGTCTTTTCTTTGATG

*Primersequenzen stammen aus (Czechowski et al. 2004);

Primer für qRT-PCR-Expressionsanalysen

AGI-Code	Genbezeichnung	Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
AT2G01010	<i>18S rRNA</i>	18SrRNA_F ¹ 18SrRNA_R ¹	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTC GCGGAGTCTATAAGCAAC
AT3G10590	-	AT3G10590_F AT3G10590_R	ACGCTGGACGGAGGACGAC TGCTGGGCGACATTCACC
AT2G43500	<i>NLP8</i>	AT2G43500_F AT2G43500_R	CAACGCTGATCGTAAAGGCC TGATGGCTCGAACTTGAACCG
AT4G34400	-	AT4G34400_F AT4G34400_R	GTGGAGGATTCTGATGACGATG CTTTCTCTGGCTTTTTGGTATTG
AT5G04390	-	AT5G04390_F AT5G04390_R	TACCAGCACCGAAGATGAGAA CCACCAAAGTAGGAGCAGACAAGAC
AT3G18780	<i>ACT2</i>	ACTIN2_F1 ACTIN2_R1 ACTIN2_F2* ACTIN2_R2*	TCCGGGCGACTTGACAGAGAA AGCGGAAGAAGATGAGATTGAGG TCCTCAGCACATTCACGAGAT AACGATTCTGGACCTGCCTCATC
AT1G52890	<i>ANAC019</i>	ANAC019_F ANAC019_R	GAGGAGGAAGTCGAGAGCAGTC CATCACATAAACCCAAACCCAC
AT5G08790	<i>ANAC081</i>	ANAC081_F ANAC081_R	GGTAGTCCATGGAGTTGTG CTAAGAGCCAGGATGAGTTG
AT5G13180	<i>ANAC083</i>	ANAC083_F ANAC083_R	CAGACCAAACAGATGATAAAAAAAAAC GAAGCATGATCGGAAGAAGGAG
AT5G64530	<i>ANAC104</i>	ANAC104_F ANAC104_R	CTCCCGGATTCTCTTCTTCA GAGTTCTGTCCCATCATCGTCTTC
AT5G43170	<i>AZF3</i>	AZF3_F AZF3_R	ATGGCGGCGATCTTGACTCTGTG GCTCCGGTGGCTCGCTTTATGA
AT1G13440	<i>GAPDH</i>	GAPDH_F1* GAPDH_R1* GAPDH_F2* GAPDH_R2*	TCTCGATCTCAATTCGCAAAA CGAAACCGTTGATTCCGATTC TTGGTGACAACAGGTCAAGCA AAACTTGTGCTCAATGCAATC
AT2G19190	<i>FRK1</i>	FRK_F FRK_R	GTTTATAGTCTGGGGTTGTCTCTC GATCACTTATATGCACCTTCTCTG
AT5G11260	<i>HY5</i>	HY5_F1 HY5_F2 HY5_F2	GTCCCGCTCTTTCTCTTTATC GATGACCTCTCGCTGCTTGATG AAGCGGCTGAAGAGGTTGTG GTCTAAGCATCTGGTTCTCGTTCTG
AT1G06180	<i>MYB13</i>	MYB13_F MYB13_R	CATTTGGCTTCTTTTGCTTTCAC GTCTTCTCCCATCTTTTCTTCC
AT1G56650	<i>MYB75</i>	MYB75_F MYB75_R	GAAGCGACGACAACAGAAAAG CCTATACAAAACGCAAAACAATG
AT1G66390	<i>MYB90</i>	MYB90_F MYB90_R	GATTGTCTCGAAGCGACGAC ATACGAAAGAAAAGCCACCCAC
AT1G74930	<i>ORA47</i>	ORA47_F ORA47_R	CAAGGGAGAAGAAGAATCGGGTTTAG GAGAAGTCGTCGGAGAAGGAATC
AT1G67090	<i>RBCS1A</i>	RBCS_F RBCS_R	CATCACAAGCAATGGGGGAAGAG CCATTTGTTGCGGAGAAGGTAGTC
AT1G79850	<i>RPS17</i>	RPS17_F RPS17_R	CGAAGCCGGAGGAGATGAAC CGGGATACACAACAACAACAGAAG
AT5G45890	<i>SAG12</i>	SAG12_F SAG12_R	GCTTTGCCGGTTTCTGTTG GTTTCCCTTTCTTTATTGTGTTG
AT5G04940	<i>SUVH1</i>	SUVH1_F SUVH1_R	CGCAACATCAGCAGCCTCAG CCGCGTTGCCATTAGACACATC
AT2G33290	<i>SUVH2</i>	P1.1 P1.2 P2.1 P2.2	GGAGCCAGGTGTGTTTC CGGCGGTGGAGGATTG GTCAGGATCATCAACACAAGCAG CCCACAGCAAACCACCAATC
AT1G73100	<i>SUVH3</i>	SUVH3_F SUVH3_R	ATCGTCTCTGCTCTTTCATCACC TCCTTGCAATTGCTAAACTCTCTA
AT5G13960	<i>SUVH4</i>	SUVH4_F SUVH4_R	GAGGGGCAACCAGAACTAATCTAC CGGAGATGTCCTCACATACCAAAC
AT2G35160	<i>SUVH5</i>	SUVH5_F SUVH5_R	CGTGCTTGATAACTCTGATGCTTTG GCTGCTGGTCTTTGGGTGG
AT2G22740	<i>SUVH6</i>	SUVH6_F SUVH6_R	GGAGAAGTGCCTGGGGTTGAG CGGCTGGCTTGGTTATG
AT1G17770	<i>SUVH7</i>	SUVH7_F SUVH7_R	CCGACGGAGCCGAAGAAGCC CCGCATCAAACGCATCATAAC
AT2G24740	<i>SUVH8</i>	SUVH8_F SUVH8_R	CCTATTAATGCTATTTGATGATGGAG CTGATCTTCTCTGTGGACTGGAC
AT4G13460	<i>SUVH9</i>	SUVH9_F SUVH9_R	ATGGGACGCTAATAAGACAGAAACC CAACCCAGCATACTCACAATAAAAAG
AT2G05900	<i>SUVH10</i>	SUVH10_F1 SUVH10_R1 SUVH10_F2 SUVH10_R2	CTAGTGGGGCTCCATTACAGG CGGGATCTTCGGTTTTGTGTCAG GCTCCATTCAGGCACCATG CATCTTTCATACATCAACCACTCTC
AT1G04820	<i>TUA4</i>	TUA4 TUA4	GCTGTTGGTGGAGGACTGG CCTGTGGAGATGGGTAACCTGTG
AT4G05320	<i>UBQ10</i>	UBQ10_F* UBQ10_R*	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
AT1G62300	<i>WRKY6</i>	WRKY6_F WRKY6_R	GCAGCAACAGCAACAACAGAAACA GACACATCTCGGCCTCACCTAC
AT2G37260	<i>WRKY44</i>	WRKY44_F1 WRKY44_R1	GAGGAAATACGGACAGAAGCAAGTTA CGCCGTGAAGAGGACAAGAT

AT2G37260	<i>WRKY44</i>	WRKY44_F2 WRKY44_R2	CCGGTGAAGAAGAAAGTAGAGAGA ACGCCGTGGAAGAGGACAAG
AT4G23810	<i>WRKY53</i>	WRKY53_F1 WRKY53_R1 WRKY53_F2 WRKY53_R2 WRKY53_F3 WRKY53_R4	CAGACGGGGATGCTACGG GGCGAGGCTAATGGTGGTG CCGATGGGCTTGATGATGG CGCGGGAAAGTTGTGTC GATCAGACGGGGATGCTACGG GGCGAGGCTAATGGTGGTG
AT2G40750	<i>WRKY54</i>	WRKY54_F WRKY54_R	GATTCGAAAAGACATTGGCTG GTCACACTGCTGGTGTGTTCTC
AT3G56400	<i>WRKY70</i>	WRKY70_F WRKY70_R	GACTATACTTGAGGACGCATTTTC TTCGAGCTCAACCTTCTGGAC

*Primersequenzen stammen aus Czechowski et al. (2004) und wurden für die Analyse der Expression putativer Referenzgene in den Transkriptionsfaktorplattformanalysen untersucht; ¹markierte Primer wurden design von Dr. Olaf Barth (AG Prof. Dr. Humbeck, MLU Halle-Wittenberg)

Primer für qPCR-ChIP-Analysen

AGI-Code	Genbezeichnung	Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
AT3G18780	<i>ACT2</i>	ACTIN2_C_F ACTIN2_C_R	CGACTAACGTTGCCTGGATTGAC CTTGGATTAGTCTTTTGTCTTGATG
AT1G04820	<i>TUA4</i>	TUA4-I_F TUA4-I_R TUA4-II_F TUA4-II_R	GCTCCGATTTTGGTTCAGTTCCT GCTCGTTTTGTGACCGTTTCTC GCTGTGGTGGAGGGACTGG CCTGTGGAGATGGGTAACCTGTG
AT2G15810	<i>MULE</i>	MULE_F MULE_R	GCTCCCTCTATGGTTACCTCTACTG GTTTCCGTGCTTGTGGCTTCTATG
-	<i>180bp SR</i>	180bp SR_F 180bp SR_R	GAATCTCAACCGGTTCTCAAAAG CCTCGTCTGCTATCAATGTGGA
AT4G18960	<i>AG</i>	AG-I_F AG-I_R AG-II_F AG-II_R	GATTTACCCAAGATTTTAGTGCCTC GAGTTATTGGTGGGTAGTCTTGTGTG CTTCTCTACTTTCCTTCTTATCTC CTAGCTAGTTTCACCTTATCACTC
AT5G13180	<i>ANAC083</i>	ANAC083-I_F ANAC083-I_R ANAC083-II_F ANAC083-II_R	CTTCCGGCTCCCTCAAACC GCCAACCTAGCTAAGTCGTCCATTC CAGACCAAACAGATGATAAAACAAAAC GAAGCATGATCGGAAGAGGAG
AT1G62360	<i>STM</i>	STM-I_F STM-I_R STM-II_F STM-II_R	CTTCTGGTCTCTCTCTGCTG CTCCCGGGATTATGCTTCAAC GCATTCATACTATATCGTTAGGGAC CACTTCATTCAGTTTTAGGATTC
AT4G23810	<i>WRKY53</i>	WRKY53-I_F WRKY53-I_R WRKY53-II_F WRKY53-II_R	GATCATATCATTCTTTCAGTCCATC CCAACCTAACATATCTCTCTCTCC CATCATCGCCAAGATTACATTTTC CTCTGGGCTTATTCTCATTTTTC
AT5G45890	<i>SAG12</i>	SAG12-I_F SAG12-I_R SAG12-II_F SAG12-II_R	CTAAAATCCGAGCAAAGTGAGTG CAGAAGGGTACTGAGATGGGGT CGTCGCTATATTTTCATCATCTGTTC CACGCGGTGTTTGTAGTCATCC

Sequenzierprimer

Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
pGEM-T-Vektorprimer SP6*	AGCTATTTAGGTGACACTATAG
pGEM-T-Vektorprimer NewT7*	GTAATACGACTCACTATAGGGC
pJET1.2_F1*	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2_R1*	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
pJET1.2_F2 ¹	TGTCCCAATTAGTAGCATCACG
pJET1.2_R2 ¹	AAGAAAACCCACGCCACCTACAAC

*Original Sequenzierprimer pGEM-T-Vektor bzw. pJET1.2-Vektor; ¹Primer von Dr. Olaf Barth (AG Prof. Dr. Humbeck, MLU Halle-Wittenberg) designt.

Primer für Dig-Markierungs-PCR FiSH des 180bp Repeats

Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
180bp_F*	GATCAAGTCATATTCGACTCCAAAAC
180bp_R*	GATCTCATGTGTATGATTGAGTATAAG

*Primerdesign erfolgte durch Dr. Andreas Fischer (AG Prof. Dr. Reuter, MLU Halle-Wittenberg)

Primer für Dig-Markierungs-PCR Northern SUVH2 (AT2G33290)

Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'
SUVH2-N_F1	CAAGAAGGAGAATGTACCCGTGTT
SUVH2-N_R1	CTCCAGCGCAAAAAGCATC
SUVH2-N_F2	CGGGCATCTATTGAAAAGGAAAG
SUVH2-N_R2	CACACGGGGGAACATCAGG

Primer für DNA-Methylierungsuntersuchungen über Bisulfitspezifische Sequenzierung

AGI-Code	Genbezeichnung	Primerbezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Ta (°C) / Amplikon (bp)
AT4G23810	WRKY53	W53-I_F	GAAATAAAATAATTATTTATGGTTTGGT	55 / 373
		W53-I_R	CTCCCAACTTAACATATCTTTCCTTCCAT	
		W53-II_F	GATATGTTAAGTTGGGAG	51 / 530
		W53-II_R	CTTATTCTCACTTTTCT	
		W53-III_F	AAGTGAGAATAAGYYYAGAGAGAGG	54 / 378
W53-III_R	CRTCTTTACCATCATCAARCCCATC			
AT1G69410	ELF5A-3	ELF5A-3_F	GGATTGTGATYGGTGTTAGTGTGAG	60 / 472
		ELF5A-3_R	CAAARAACAAAACCCTCTAATTCAACCA	
AT2G15810	MULE	MULE_BS_F	AGAAGGATTTGGAGTTAGGTGTGGG	60 / 394
		MULE_BS_R	CTTCTTCCTARCATCCCTTAATCC	

Neben den Primersequenzen sind zudem die über Gradienten-PCR (s. Kapitel V.2.5.2.3) bestimmten *Annealing*-Temperaturen (Ta) sowie die Länge der amplifizierten PCR-Fragmente (inklusive der Primersequenzen) gegeben. Die Cytosine, die in den Primersequenzen vorkommen, wurden durch degenerierte Basen (Y für C im *forward* Primer sowie R für G im *reverse* Primer jeweils komplementär zum analysierten kodierenden DNA Strang) ersetzt, um eine bevorzugte Amplifikation von nicht konvertierter DNA zu vermeiden.

Primer für die TF-Plattformanalysen

Die Primersequenzen für die 1870 Gene, die für TFs oder TRs kodieren und deren Expression in den TF-Plattformexperimenten untersucht wurde, sind aus Platzgründen nicht in dieser Arbeit aufgeführt. Die entsprechenden Sequenzen können jedoch in einer zu dieser Arbeit entstandenen Publikation nachgelesen werden (Ay et al. 2013; *Supplementary DS 5b*). Die Primer wurden zudem von Czechowski et al. (2004) generiert und untersucht.

- CURRICULUM VITAE -**PERSÖNLICHE ANGABEN**

Name: Nicole Ay (geb. Sommer)
 Geburtsdatum: 29. März 1979
 Geburtsort: Halle (Saale)
 Wohnsitz/Anschrift: Universitätsring 6, 06108 Halle (Saale)
 Familienstand: verheiratet, ein Kind

WERDEGANG

01/2014 - heute **Selbständig**
 10/2013 - heute **Anfertigen der Dissertationsschrift**
 Titel: „Dynamik von Chromatinmodifikationen und ihr Einfluss auf regulatorische Faktoren der Blattseneszenz in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“
 06/2011 - 08/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institutsbereich Pflanzenphysiologie
Forschungsschwerpunkte: DFG finanziertes Drittmittelprojekt
 Titel: „Das seneszenzassoziierte Kernprotein HvS40, ein Mitglied der DUF584-Familie – Untersuchungen zur Regulation und zur möglichen Funktion während der Blattseneszenz“
 07/2010 - 06/2011 **Elternzeit**
 02/2010 - 07/2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institutsbereich Pflanzenphysiologie
Forschungsschwerpunkte: DFG finanziertes Drittmittelprojekt
 Titel: „Das seneszenzassoziierte Kernprotein HvS40, ein Mitglied der DUF584-Familie – Untersuchungen zur Regulation und zur möglichen Funktion während der Blattseneszenz“
 07/2009 – 02/2010 **Regionalmanagerin**
 LMI Deutschland GmbH, Dresden
Aufgabenschwerpunkte: Führungskräfteentwicklung; Personalrecruiting;
 Trainerin „*Youth Leader Concept*“
 03/2005 - 07/2009 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institutsbereich Pflanzenphysiologie
Forschungsschwerpunkte: Arbeit am Dissertationsthema
 08/2004 - 02/2005 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 09/2003 - 07/2004 **Diplomarbeit**
 Titel: „Identifizierung und Charakterisierung von neuen seneszenzassoziierten Genen aus Primärblättern von *Hordeum vulgare* L.“
 09/1997 - 07/2004 **Studium Diplom-Biologie**
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Schwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Genetik, Biochemie, Phytopathologie
 1996 - 1997 **Allgemeine Hochschulreife**
 Europa - Gymnasium, Dessau

Veröffentlichungen & Auszeichnungen

Internationale Veröffentlichungen

Ay et al. (2014a) “Epigenetic control of plant senescence and linked processes.” *Journal of Experimental Botany*.
Ay et al. (2014b) “Regulatory factors of leaf senescence are affected in Arabidopsis plants overexpressing the histone methyltransferase SUVH2” *J Plant Growth Regul*.
Ay et al. (2009) “Epigenetic programming via histone methylation at *WRKY53* controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*.” *The Plant Journal*.
Ay et al. (2008) “Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves” *Plant Biology*.
Janack¹ and Ay¹ et al. (2014) Studies on epigenetics of plant senescence. (*Submitted*)
¹authors contributed equally to the work
Ay¹ and Janack¹ et al. (2014) Senescence-specific histone modifications and DNA methylation at the senescence-associated gene *HvS40* in barley. (*In preparation*)
¹authors contributed equally to the work

Auszeichnungen

Poster Award Winner
 “2. International PhD school Plant Development“ (Deutschland, Retzback 2009)
Reinhold-von-Sengbusch-Preis
 21. Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ (Deutschland, Dabringhausen 2008)
FESPB Poster Award Winner
 “Federation of European Societies of Plant Biology” (Polen, Krakau 2004)
Zertifikation “Effective Personal Leadership”-Management-Programm (Deutschland, 2009)

- EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG -

Ich erkläre an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Dynamik von Chromatinmodifikationen und ihr Einfluss auf regulatorische Faktoren der Blattseneszenz in *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 29.Oktober 2014

Nicole Ay