

**„Die Analyse von heterochromatischem Gen-*Silencing*  
in *Arabidopsis thaliana*“**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Kristina Irmner  
geb. am 19.06.1981 in Torgau

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter  
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck  
3. Prof. Dr. Ueli Grossniklaus

Einreichung der Promotion: 27.10.2014

Tag der mündlichen Verteidigung: 22.09.2015

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Abkürzungsverzeichnis	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1	Verwendete Materialien .....	12
2.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme, Antikörper, Oligonukleotide.....	12
2.1.2	Mikroorganismen .....	13
2.1.3	Pflanzenmaterial .....	13
2.1.4	Sequenzen.....	15
2.1.5	Vektoren.....	15
2.1.6	Anzucht des pflanzlichen Materials.....	15
2.1.7	Bakterielle Nährmedien.....	16
2.2	Angewandte Methoden.....	16
2.2.1	Isolation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	17
2.2.3	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
2.2.4	Isolation und Nachweis von doppelsträngiger RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.2.5	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und <i>Real-Time-PCR</i> .....	19
2.2.6	Statistische Analysen.....	21
2.2.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	22
2.2.8	Semiquantitative RT-PCR .....	22
2.2.9	Analyse von 5'-Enden von cDNAs (5'-RACE-PCR).....	23
2.2.10	Kolonie-PCR .....	23
2.2.11	Restriktion mit Restriktionsendonukleasen.....	23
2.2.12	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren .....	23
2.2.13	Agarosegelelektrophorese.....	24
2.2.14	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	24
2.2.15	Sequenzierung .....	24
2.2.16	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.2.17	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
2.2.18	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25

2.2.19	Histonpräparation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
2.2.20	Gelelektrophorese von Histonen (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	26
2.2.21	Aufreinigung von V5/His-Fusionshistonen unter denaturierenden Bedingungen.....	26
2.2.22	Immunozytologischer Nachweis von V5/His-Fusionshistonen.....	27
2.2.23	Immunozytologischer Nachweis von Proteinen im <i>Western-Blot</i> .....	28
2.2.24	Basta <sup>®</sup> -Selektion von positiv transformierten Pflanzen.....	29
2.2.25	Messung der Luciferaseaktivität.....	29
2.2.26	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1	Heterochromatisches Gen- <i>Silencing</i> des transgenen <i>LUCIFERASE</i> -Repeats.....	31
3.1.1	Histonmodifizierungen und Repeat-abhängiges TGS des <i>LUC</i> -Transgens.....	31
3.1.2	TGS von <i>LUC</i> -Repeats und die differentielle Bildung von kodierenden und nichtkodierenden <i>sense</i> -Transkripten.....	35
3.1.3	TGS von <i>LUC</i> -Repeats und die Bildung von <i>antisense</i> -Transkripten.....	39
3.1.4	<i>Antisense</i> -Transkripte an <i>LUC</i> -Repeats sind Polymerase V-abhängig.....	40
3.1.5	Polymerase V-abhängige RNA-Transkripte überlappen kodierende und nichtkodierende Bereiche der <i>LUC</i> -Repeats.....	43
3.1.6	Für die Startpunkte von Pol V-Transkripten konnten keine spezifischen Sequenzmotive gefunden werden.....	47
3.1.7	TGS am <i>LUC</i> -Repeat ist unabhängig von der Bildung von siRNAs.....	49
3.1.8	Einfluss von TGS-Suppressormutanten auf Histonmodifizierungen an <i>LUC</i> -Repeats.....	52
3.1.9	Epigenetische Effekte an mobilen Elementen fordern grundlegende heterochromatische Prozesse.....	57
3.2	Markierung von Histonvarianten zur Analyse bekannter und neuer Histonmodifizierungen.....	60
3.2.1	Klonierung von Histonvarianten mit V5/His.....	60
3.2.2	Spezifische euchromatische und heterochromatische Assoziation der V5/His fusionierten Histonvarianten.....	63
3.2.3	Isolation und Aufreinigung von H3.1-V5/His.....	67
3.2.4	Kreuzung der Histonfusionskonstrukte mit TGS-Suppressormutanten.....	69
3.2.5	Nachweis von H3.1-V5/HIS am <i>LUCIFERASE</i> -Locus.....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>
4.1	Die Rolle von nichtkodierenden RNA-Transkripten im Transkriptionellen Gen- <i>Silencing</i> des <i>LUCIFERASE</i> -Repeats.....	72
4.2	Der Einfluss von Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung auf das Transkriptionelle Gen- <i>Silencing</i> des <i>LUCIFERASE</i> -Repeats.....	79
4.3	Die Etablierung von heterochromatischem Gen- <i>Silencing</i> am <i>LUC</i> -Repeat und daran beteiligte Faktoren.....	81

4.4	Das Zusammenspiel von RNA-Transkripten und DNA- und Histon-Methylierung am <i>LUC</i> -Transgen.....	96
4.5	Reaktivierung von mobilen Elementen in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten.....	97
4.6	Spezifische eu- und heterochromatische Assoziation von V5/His-Histon-Fusionsproteinen .....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>
7.1	Primerliste.....	121
7.2	<i>Dot-Blot</i> -Analysen.....	123
7.3	Histonalignements.....	123
7.4	Herstellung der T-DNA-Histonfusionskonstrukte.....	126

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: ChIP-Analysen von euchromatischen und heterochromatischen Histonmethylierungen am <i>35S::LUCIFERASE</i> -Transgen in den Luc-Linien. ....	33
Abb. 3.2: Analyse der <i>LUCIFERASE</i> -Expression in den Luc-Linien. ....	36
Abb. 3.3: Nachweis von <i>sense</i> -Transkripten in einer kodierenden und <i>35S</i> -Promotor überlappenden nichtkodierenden Region der <i>LUC</i> -Repeats in Luc-Linien. ....	38
Abb. 3.4: Nachweis von <i>antisense</i> -Transkripten in einer kodierenden und <i>35S</i> -Promotor überlappenden Region des <i>LUC</i> -Repeats in Luc-Linien. ....	40
Abb. 3.5: Nachweis von mRNA und nichtkodierenden <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Transkripten am <i>LUC</i> -Repeat in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	42
Abb. 3.6: RLM-5'RACE-Analyse der 5'-Enden von Pol V-abhängigen <i>LUC</i> Transkripten in der Linie Luc7. ....	44
Abb. 3.7: Pol V-abhängige <i>antisense</i> -Transkripte überlappen kodierende ( <i>LUC</i> ) und nichtkodierende ( <i>35S</i> ) Genbereiche im <i>LUC</i> -Transgen. ....	46
Abb. 3.8: Sequenzalignement der drei identifizierten <i>antisense</i> -Transkripte am <i>LUC</i> -Repeat. ....	46
Abb. 3.9: Multiples Alignment zur Identifizierung einer putativen Initiationssequenz für die <i>antisense</i> -Transkription am <i>LUC</i> -Repeat. ....	48
Abb. 3.10: Analyse von spezifischen Basenabfolgen in den <i>35S::LUCIFERASE</i> -Sequenzbereichen stromaufwärts der drei identifizierten <i>antisense</i> -Transkriptionsstartpunkte. ....	49
Abb. 3.11: Nachweis von doppelsträngiger RNA (dsRNA) am <i>LUC</i> -Transgen in der Linie Luc 8. ....	51
Abb. 3.12: ChIP-Analyse der euchromatischen Methylierung H3K4me2 in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	53
Abb. 3.13: ChIP-Analyse der euchromatischen H3K9-Acetylierung in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	54
Abb. 3.14: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K9me2 in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	54
Abb. 3.15: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K27me1 in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	55
Abb. 3.16: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K27me2 in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	56
Abb. 3.17: ChIP-Analyse zum Nachweis von assoziierten Nukleosomen am <i>35S</i> -Promotor und am <i>LUC</i> -Gen in <i>Silencing</i> Suppressormutanten. ....	57
Abb. 3.18: Reaktivierung von transponiblen Elementen in <i>Silencing</i> -Suppressormutanten. ....	58
Abb. 3.19: Schematische Darstellung der klonierten und verwendeten Histon-V5/His-Konstrukte. ....	62
Abb. 3.20: Spezifische eu- und heterochromatische Lokalisation der Histonfusionsproteine unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. ....	64

Abb. 3.21: Spezifische euchromatische und heterochromatische Assoziation der Histonfusionsproteine H3.1-V5/His, H3.3-V5/His, H3.3[Synthetisch]-V5/His und H4-V5/His.....	66
Abb. 3.22: Immunozytologischer Nachweis der Fusionshistone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His nach chromatographischer Isolation und Nachweis von H3K9me2 an den Fusionshistonen ...	68
Abb. 3.23: Assoziation von H3.1-V5/His am <i>LUCIFERASE</i> -Locus.....	71
Abb. 7.1: <i>Dot-Blot</i> zur Analyse der Spezifikation von Antikörpern.....	123
Abb. 7.2: Alignement der durch multiple Gensequenzen kodierten Proteinsequenz von H3.1, H3.3 und H4 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	123
Abb. 7.3: Alignement der fünf Gensequenzen, die für H3.1 kodieren.....	124
Abb. 7.4: Alignement der drei Gensequenzen, die für H3.3 kodieren.....	124
Abb. 7.5: Alignement der acht Gensequenzen, die für H4 kodieren.....	125
Abb. 7.6: Graphische Darstellung der verwendeten Vektoren.....	128

### III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper für biochemische und immunozytologische Analysen.....	12
Tab. 2.2: Verwendete Luc-Linien und Histonfusionslinien.....	13
Tab. 2.3: Verwendete <i>Silencing</i> -Suppressormutanten.....	14
Tab. 2.4: Verwendete Vektoren.....	15
Tab. 2.5: Einteilung des Signifikanzniveau.....	22
Tab. 2.6: Verwendete Lösungen und Konzentrationen für SDS-Polyacrylamid-Gele.....	26
Tab. 7.7: Verwendete Primer für Klonierung, RT-PCR und ChIP-Analysen.....	121

## IV Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin-Nukleotid	<b>K</b>	Aminosäure Lysin
<b>A</b>	Aminosäure Alanin	<b>Kb</b>	Kilobasenpaar
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>L</b>	Aminosäure Leucin
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>LacZ<math>\alpha</math></b>	$\alpha$ -Untereinheit der $\beta$ -Galactosidase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>LUC</b>	<i>LUCIFERASE</i> -Gen
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>mA</b>	milli-Ampere
<b>BAR</b>	Basta <sup>®</sup> -Resistenzgen; Phosphinothricinacetyltransferase	<b>MCS</b>	<i>Multiple Cloning Site</i>
<b>bp</b>	Basenpaar	<b>me1</b>	Monomethylierung
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>me2</b>	Dimethylierung
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>me3</b>	Trimethylierung
<b>C</b>	Cytosin-Nukleotid	<b>mg</b>	Milligramm
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>min</b>	Minuten
<b>ca.</b>	Zirka	<b>MMS</b>	Methylmethansulfonat
<b>CaMV</b>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>Col-0</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i>	<b>N</b>	eines der Nukleotide A, C oder T
<b>CCD</b>	<i>Charge Coupled Device</i>	<b>N</b>	Aminosäure Asparagin
<b>D</b>	Aminosäure Asparaginsäure	<b>NP40</b>	Nonident P40
<b>ChIP</b>	Chromatin-Immunopräzipitation	<b>NPT II</b>	Neomycinphosphotransferase Gen
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	<b>N-terminal</b>	Amino-Terminus eines Proteins
<b>dATP</b>	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat	<b>P</b>	Phosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>P</b>	Aminosäure Prolin
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease	<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>dNTP</b>	Desoxynucleosid-5'-triphosphat	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreit	<b>pH</b>	<i>potentia Hydrogenii</i>
<b>E</b>	Aminosäure Glutaminsäure	<b>P</b>	Aminosäure Phenylalanin
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat	<b>PMSF</b>	Phenylmethansulfonylfluorid
<b>EMS</b>	Ethylmethansulfonat	<b>Pol</b>	Polymerase
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> ; und andere	<b>Poly-A</b>	Polyadenin-Schwanz
<b>F(x)</b>	Generation nach Kreuzung (Filiargeneration)	<b>PTGS</b>	<i>Post Transcriptional Gene Silencing</i>
<b>Fe</b>	Symbol für Eisen (Ferrum)	<b>Q</b>	Aminosäure Glutamin
<b>FISH</b>	Fluoreszenz- <i>In Situ</i> -Hybridisierung	<b>R</b>	Aminosäure Arginin
<b>g</b>	Gramm	<b>rDNA</b>	ribosomale DNA
<b>G</b>	Guanin-Nukleotid	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>G</b>	Aminosäure Glycin	<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>	<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>GUS</b>	$\beta$ -Glucuronidase	<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>h</b>	Stunden	<b>RT</b>	<i>Reverse</i> Transkription
<b>HPT</b>	Hygromycinphosphotransferase-Gen	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>H1</b>	Histonprotein 1	<b>S</b>	Symbol für Schwefel (Sulfur)
<b>H2</b>	Histonprotein 2	<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
<b>H3</b>	Histonprotein 3	<b>SET</b>	<u>Su</u> (var)3-9 / <u>Enhancer of Zeste</u> / <u>Trithorax</u>
<b>H4</b>	Histonprotein 4	<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>H3K9</b>	Histon H3 Lysin 9	<b>SSC</b>	<i>Standard Saline Citrate</i>
<b>H3K4</b>	Histon H3 Lysin 4	<b>SSLP</b>	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
<b>H2K27</b>	Histon H3 Lysin 27	<b>SU(VAR)</b>	<i>Suppressor of variegation</i>
<b>H3K36</b>	Histon H3 Lysin 36	<b>SUVH</b>	SU(VAR)3-9 - Homolog
<b>HAT</b>	Histonacetyltransferase	<b>T</b>	Thymin-Nukleotid
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase	<b>T</b>	Aminosäure Threonin
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>HMTase</b>	Histonmethyltransferase	<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>HPT</b>	Hygromycinphosphotransferase	<b>T-DNA</b>	Transfer-DNA
<b>I</b>	Aminosäure Isoleucin	<b>TEMED</b>	N,N,N,N,'- Tetramethylendiamin
		<b>TGS</b>	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
		<b>Tris</b>	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
		<b>U</b>	<i>Units</i>
		<b>u.a.</b>	unter anderem



<b>UV</b>	ultraviolett	<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
<b>V</b>	Volt	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>w/v</b>	Masse je Volumen	<b><math>\alpha</math></b>	alpha
<b>WT</b>	Wildtyp	<b><math>\mu</math></b>	mikro
<b>W</b>	Aminosäure Tryptophan	<b>#</b>	Stop-Codon

## 1 Einleitung

Nach einer stabilen Integration von Transgenen kommt es oft zu Veränderungen in der Transgenexpression bis hin zur vollständigen Geninaktivierung, indem entweder die Transkription des Transgens inhibiert oder transkribierte mRNA degradiert wird. Diesem als Gen-*Silencing* bezeichneten Phänomen kommt eine besondere Bedeutung zu, da an der Inaktivierung von Transgenen wahrscheinlich die gleichen Regulationsmechanismen beteiligt sind, welche auch die Genexpression von endogenen Genen steuern. Die Analyse dieser komplexen epigenetischen Steuerungsmechanismen hat damit eine große Bedeutung in fast allen Bereichen der Biologie und Medizin. Unter dem Begriff Epigenetik werden Mechanismen von vererbten Chromatin-Modifizierungen und damit verbunden vererbten und stabilen spezifischen Genexpressionsmustern auf die nächste Zellgeneration zusammengefasst, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen (Waddington 1942; Holliday 1994). Wichtige epigenetische Prozesse sind die Modifikationen von DNA-Basen durch Methylierung, Modifikationen von Histonen und durch RNA-Interferenz (RNAi) vermittelte Mechanismen. Die reversiblen epigenetischen Modifizierungen spielen eine essentielle Rolle bei der Steuerung von verschiedenen Entwicklungsprozessen, indem sie die Organisation der Chromatinstruktur und den Verpackungsgrad der DNA beeinflussen. Diese Modifizierungen sind damit an der Etablierung von aktiven oder inaktiven Genbereichen des Chromatins beteiligt (Lachner und Jenuwein 2002).

Bereits 1928 unterschied Emil Heitz lichtmikroskopisch zwei verschiedene Chromatinzustände in Mooszellen, welche als Euchromatin und Heterochromatin bezeichnet werden (Heitz 1928). Euchromatin ist aufgelockert und transkriptionell aktiv. Im Gegensatz dazu ist das Heterochromatin stark kondensiert und transkriptionsinaktiv, wobei zwischen fakultativem und konstitutivem Heterochromatin differenziert wird (Fransz *et al.*, 2006). Konstitutives Heterochromatin bleibt während des gesamten Zellzyklus kondensiert (Lima di Faria und Jaworska 1968) und umfasst repetitive DNA-Sequenzen der perizentromeren und telomeren Chromosomenregionen. Fakultatives Heterochromatin entsteht wiederum durch Heterochromatisierung von euchromatischen Regionen, was zum Gen-*Silencing* führt (Lohe *et al.*, 1993; Laurent *et al.*, 1997). In Pflanzen ist ein großer Teil des Genoms heterochromatisch organisiert und es finden extensive heterochromatische Gen-*Silencing*-Prozesse statt. Charakteristisch für Heterochromatin und heterochromatisches Gen-*Silencing* ist die epigenetisch stabile Weitergabe von kondensierten und transkriptionell inaktiven Chromatinzuständen (Naumann *et al.*, 2005).

Aufgrund der Erkenntnisse in den letzten Jahren wurden nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) essentielle Funktionen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Chromatinstrukturen und Gen-*Silencing* zugesprochen, indem sie mit den Chromatin-modifizierenden Enzymen interagieren (Wierzbicki *et al.*, 2008; Haag *et al.*, 2011). Durch die Regulation der Genexpression spielen diese ncRNAs damit eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen. In genomweiten Analysen wurde eine große Anzahl dieser nichtkodierenden RNAs in Säugern und Pflanzen gefunden. Damit ist die Transkription nicht nur auf Proteinkodierende Gene beschränkt, sondern es werden auch intergenische, *antisense* und abweichend prozessierte RNAs synthetisiert (Cabili *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012a; Wierzbicki *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Fast 80% des menschlichen Genoms scheint demnach transkriptionell aktiv zu sein, während jedoch weniger als 1,5 % für Proteine kodiert (Djebali *et al.*, 2012; ENCODE Project Consortium 2012).

Generell werden die nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) aufgrund ihrer Größe in kleine RNAs (*small*-RNAs) und in lange, nichtkodierende RNAs (lncRNAs) differenziert. Die *small interfering*-RNAs (siRNAs) gehören neben den micro-RNAs (miRNA) und den PIWI *interacting*-RNAs (piRNAs) zu der Klasse der 21 bis 24 Nukleotide kurzen *small*-RNAs (Castel und Martienssen 2013). Als *long noncoding* RNAs (lncRNAs) werden hingegen RNA-Transkripte definiert, die länger als 200 bp sind und auf Grund ihrer genomischen Lokalisation als natürliche *antisense*-Transkripte (NATs), lange intronische ncRNAs oder als lange intergenische ncRNAs (lincRNAs) klassifiziert werden (Liu *et al.*, 2012a).

In *Arabidopsis thaliana* sind die zwei pflanzenspezifischen und spezialisierten RNA-Polymerasen IV (Pol IV) und V (Pol V) an der Synthese von zwei lncRNA-Klassen beteiligt, welche in RNA-abhängigem *Silencing* involviert sind (Wierzbicki 2012). Diese lncRNAs haben mindestens zwei verschiedene Funktionen. Einmal sind sie Vorläufertranskripte in der Biogenese von *small interfering RNAs* (siRNAs), andererseits unterstützen sie die siRNAs in der Erkennung ihrer homologen Zielsequenzen und sind essentiell für die RNA-abhängige Etablierung von Chromatinmodifikationen (Moazed 2009; Cam *et al.*, 2009).

Die Rolle von RNA-vermitteltem *Silencing* wurde bereits für verschiedene biologische Prozesse in Eukaryoten aufgeklärt. Unter anderem ist es an der Kontrolle der Genexpression von Entwicklungsprozessen, wie X-Inaktivierung (Ogawa *et al.*, 2008), der Blühinduktion (Heo und Sung 2011), der Chromosomensegregation (Volpe *et al.*, 2003) sowie bei Abwehrmechanismen, wie dem *Silencing* von einigen transponiblen Elementen oder Viren, beteiligt (Matzke *et al.*, 1999; Matzke *et al.*, 2000; Lippman *et al.*, 2003). RNA-induziertes Gen-*Silencing* wird durch die Anwesenheit von sequenzspezifischen, doppelsträngigen RNAs

(dsRNAs) ausgelöst, was als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet wird. RNAi wurde von Fire *et al.* (1998) in *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Es wird grundsätzlich zwischen zwei auf RNAi basierenden Mechanismen unterschieden, die zur Inaktivierung eines Gens führen können. Die Geninaktivierung durch einen schnellen Abbau der transkribierten mRNA wird als posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS-*Post Transcriptional Gene Silencing*) bezeichnet (Hamilton und Baulcombe 1998). Wird im Gegensatz zu PTGS die Inaktivierung nicht durch mRNA-Abbau, sondern durch Unterbindung der Transkription eines Gens realisiert, spricht man von transkriptionellem Gen-Silencing (TGS) (Assaad *et al.*, 1993; Mittelsten Scheid, *et al.*, 1998; Aufsatz *et al.*, 2002).

PTGS beruht auf dem kanonischen RNAi-Syntheseweg, bei dem die transkribierte mRNA mittels sequenzhomologer siRNAs (*small interfering RNA*) degradiert wird (Zamore *et al.*, 2000). PTGS muss dabei in jeder neuen Generation erst nach dem Überschreiten eines bestimmten mRNA-Schwellenwertes erneut initiiert werden (Depicker und Van Montagu 1997; Finnegan *et al.*, 1998; Stam *et al.*, 1997). Bei der Initiierung wird der zur Ziel-mRNA komplementäre Strang von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RDR) synthetisiert und es entsteht doppelsträngige RNA (dsRNA), die von einem Ribonuklease III-Enzym (DICER) in 21 bis 24 Nukleotide kurze siRNAs zerschnitten wird (Lipardi *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton und Baulcombe 1999). Diese siRNAs assoziieren mit dem RNA-induziertem Silencing-Komplex (RICS) und vermitteln anschließend die gezielte Degradierung von homologen mRNAs (Zamore *et al.*, 2000). Mit der Entdeckung, dass RNAi auch eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Chromatinmodifikationen spielt, wurde die anfänglich strikte Trennung von TGS und PTGS in Frage gestellt (Stevenson und Jarvis 2003).

Über TGS werden bevorzugt Gene inaktiviert, welche im Genom in zahlreichen Kopien als direkte oder invertierte Sequenzwiederholungen vorliegen (Meyer 2000; Assaad *et al.*, 1993). Deshalb werden für TGS oft auch die Begriffe Homologie-abhängige Geninaktivierung (*homology dependent gene silencing*) oder Repeat-induzierte Geninaktivierung (*repeat induced gene silencing*) verwendet (Meyer und Saedler 1996; Ye und Signer 1996). TGS wird stabil über die Meiose vererbt und ist damit eine wichtige Voraussetzung für verschiedene chromatinvermittelte Regulationsmechanismen im Laufe der Entwicklung (Depicker und Van Montagu 1997; Park *et al.*, 1996). Dabei ist TGS durch charakteristische Chromatinmodifikationen, wie DNA-Methylierungen, Histon-Methylierungen und Histon-Deacetylierungen, an den inaktivierten Loci gekennzeichnet (Morel *et al.*, 2000; Probst *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2004; Baubec *et al.*, 2010).

In Eukaryoten ist die DNA in Chromatin verpackt, welches sich aus DNA, Proteinen und RNA zusammensetzt. Die Nukleosomen bilden dabei die kleinsten Struktureinheiten des Chromatins und sind jeweils aus einem Histonoktamer mit je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und einer DNA-Sequenz von 146 Basenpaaren, welche um das Histonoktamer gewunden ist, aufgebaut (Luger *et al.*, 1997). Die N-terminalen Enden der Histone ragen aus dem Nukleosom heraus, die durch Histon-modifizierende Enzyme, wie beispielsweise Histon-Methyltransferasen und Histon-Acetyltransferasen, modifiziert werden (Baumbusch *et al.*, 2001; Pontvianne *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2002; Earley *et al.*, 2007).

Das Histon H3 kann beispielsweise an verschiedenen Lysinresten, wie Lysin 4 (K4), Lysin 9 (K9) und Lysin 27 (K27), methyliert werden. Neben Methylierungen sind auch Acetylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen, ADP-Ribosylierungen und Sumoylierungen wichtige posttranslationale kovalente Modifizierungen (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001). Mono-, Di- und Trimethylierungen (me1, me2 und me3) der Lysinreste erhöhen dabei die Komplexität epigenetischer Histonmarkierungen und sind spezifisch für euchromatische und heterochromatische Gensequenzen.

In verschiedenen Organismen wurden allerdings signifikante Unterschiede in der Markierung heterochromatischer Chromatindomänen identifiziert. Heterochromatin in *Arabidopsis* ist z.B. durch Hypoacetylierung der Lysinreste in den Histonen H3 und H4 sowie durch Mono- und Dimethylierungen von H3K9 und H3K27 gekennzeichnet (Soppe *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2005; Lindroth *et al.*, 2004; Naumann *et al.*, 2005). Die H3K9-Dimethylierung (H3K9me2) ist dabei die häufigste vorkommende Histon-Methylierung in *Arabidopsis* und wurde in hohen Mengen an Repeats, Transposons und Pseudogenen detektiert (Bernatavichute *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu sind Methylierungen von H3K4 und H3K36 sowie die H3K9-Acetylierung (H3K9ac) an transkriptionell aktiven Genen von *Arabidopsis* nachgewiesen worden (Lawrence *et al.*, 2004; Earley *et al.*, 2006; Xiu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). In Säugern sind wiederum Trimethylierungen von H3K9 und H4K20 (H3K9me3, H4K20me3) und Monomethylierungen von H3K27 (H3K27me1) typisch für konstitutives Heterochromatin (Peters *et al.*, 2003; Schotta *et al.*, 2004), wohingegen Heterochromatin in *Drosophila melanogaster* durch Methylierungen von H3K9 und H3K27 sowie durch Trimethylierung von H4K20 gekennzeichnet ist (Ebert *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2004). Die verschiedenen Modifizierungen und Modifizierungsmuster bilden dabei einen Histon-Code, welcher die Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA beeinflusst. Des Weiteren stellen die Modifizierungen Bindungsstellen für andere Proteine dar, die wiederum Einfluss auf Chromatinstruktur und Genexpression nehmen (Strahl und Allis 2000).

Die Histone sind hochkonservierte Proteine mit geringen Variationen in der Aminosäuresequenz innerhalb der Eukaryoten. Die nichtallelischen Gene der Core-Histonfamilien kodieren entweder für identische Histonproteine oder für verschiedene Histonisoformen, welche als Histonvarianten bezeichnet werden (Malik und Henikoff 2003). Diese Histonvarianten werden in die zwei Hauptklassen der S-Phase-abhängigen und S-Phase-unabhängigen Histonvarianten unterschieden. Die kanonischen Histone werden während der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus exprimiert und während der Replikation in Nucleosomen des neu synthetisierten DNA-Stranges eingebaut (Henikoff und Ahmad 2005; Osley 1991). Außerhalb der S-Phase findet außerdem ein ständiger Nucleosomenzusammenbau an DNA-Reparaturstellen und Transkriptionsstellen statt (Martini *et al.*, 1998). Während dieser replikationsunabhängigen Prozesse werden Histonvarianten eingebaut, die somit vor allem in transkriptionsaktiven Bereichen lokalisiert sind, während die replikationsabhängigen Histonvarianten an heterochromatischen Regionen assoziiert bleiben (Johnson *et al.*, 2004).

Die Familie der H3-Histone umfasst in den meisten Eukaryoten die drei Histonvarianten CenH3, H3.1 und H3.3. Es wurden außerdem H3.3-ähnliche Varianten beschrieben, die ebenfalls replikationsunabhängig exprimiert werden (Okada *et al.*, 2005). Das Genom von *Arabidopsis* umfasst insgesamt 15 *HISTONE THREE RELATED (HTR)*-Gene, die für verschiedene H3-Histone kodieren (www.chromdb.org). Die Histonvariante H3.1 wird dabei von fünf Genen (HTR1, HTR2, HTR3, HTR9, HTR13), H3.3 von drei Genen (HTR4, HTR5, HTR8) sowie die H3.3-ähnlichen Varianten von vier Genen (HTR6, HTR10, HTR14, HTR15) kodiert (www.chromdb.org, siehe Anhang Abb. 7.3; Ingouff *et al.*, 2010). *HTR7* und *HTR11* sind wahrscheinlich Pseudogene (Okada *et al.*, 2005). Die zentromere H3-Variante (CenH3/HTR12) ist in Eukaryoten essentiell für die Kinetochor-Assemblierung und Chromosomensegregation in der Mitose und Meiose (Dalal *et al.*, 2007; Lermontova *et al.*, 2011).

Die S-Phase unabhängige Histonvariante H3.3 unterscheidet sich in den meisten Pflanzen und Tieren in nur vier Aminosäuren von der H3.1-Variante (Ahmad und Henikoff 2002; Shi *et al.*, 2011). Diese Unterschiede zwischen H3.1 und H3.3 sind in *Drosophila* an den Aminosäurepositionen 31 (Ala vs. Ser), 87 (Ser vs. Ala), 89 (Val vs. Ile) und 90 (Met vs. Gly) und im Menschen an der zusätzlichen Aminosäureposition 96 (Cys vs. Ser) definiert (Shi *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* unterscheidet sich H3.1 in den Aminosäurepositionen 31 (Ala vs. Thr), 41 (Phe vs. Tyr), 87 (Ser vs. His) und 90 (Ala vs. Leu) von H3.3. Die in anderen Organismen gefundene Aminosäuresubstitution an Position 89 fehlt somit in

*Arabidopsis*, dafür konnte eine zusätzliche Substitution an Position 41 nachgewiesen werden (Ahmad und Henikoff 2002; Malik und Henikoff 2003; Okada *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2011). Außerdem verfügen die *H3.3*-Gene im Gegensatz zu den *H3.1*-Genen über Intronsequenzen, welche neben charakteristischen Promotorregionen für die Replikations-unabhängige Expression verantwortlich sind (Okada *et al.*, 2005).

Die Struktur des Chromatins wird jedoch nicht nur durch Histonmodifizierungen, sondern auch durch Methylierung der DNA beeinflusst. Im Gegensatz zu Säugetieren, die vorwiegend CpG-Methylierung aufweisen, methylieren Pflanzen 5-Methylcytosine in symmetrischen CpG- und CpNpG-Motiven sowie in asymmetrischen CpNpN-Motiven (N=A, T oder C) (Finnegan *et al.*, 2000; Cao und Jacobsen 2002). Die heterochromatischen Histonmethylierungen und die DNA-Methylierung stehen dabei in einem unmittelbaren Zusammenhang. Gegenwärtige Ergebnisse zeigen auf, dass sowohl DNA-Methylierung von H3K9-Methylierung abhängt, aber auch die heterochromatische H3K9-Methylierung eine DNA-Methylierung voraussetzt. Genomweite Analysen belegen eine Korrelation zwischen heterochromatischer H3K9-Dimethylierung und CpNpG-Methylierung (Bernatavichute *et al.*, 2008). Die CpNpG-Methylierung wird in *Arabidopsis* durch H3K9- und H3K27-Methylierung kontrolliert, indem CMT3 mit H3K9- und H3K27 methyliertem Chromatin interagiert (Jackson *et al.*, 2002). Die Beteiligung von H3K9- und DNA-Methylierung bei der Etablierung von Heterochromatin und heterochromatischem Gen-*Silencing* wurde außerdem in Studien über die SU(VAR)3-9 homologen Histon-Methyltransferasen SUVH4 (KRYPTONITE), SUVH5 und SUVH6 analysiert. Die *SUVH*-Mutanten zeigten sowohl Reduktionen von H3K9me2 als auch Reduktionen der DNA-Methylierung (Jackson *et al.*, 2004; Ebbs *et al.*, 2005; Ebbs und Bender 2006). Außerdem konnte für SUVH-Methyltransferasen eine Bindung an methylierte Sequenzen nachgewiesen werden (Johnson *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Ebbs und Bender 2006). Die DNA-Methylierung und H3K9-Methylierung sind somit wichtige epigenetische Modifikationen und essentiell für die Etablierung von heterochromatischem Gen-*Silencing*, wobei ein allgemeingültiger Mechanismus des Zusammenspiels von DNA- und Histonmethylierungen bisher nicht belegt ist.

Die Methylierung von unmethylierter DNA wird als *de novo*-Methylierung bezeichnet, während *maintenance*-Methylierung an hemimethylierter DNA an CpG und CpNpG-Sequenzen nach der Replikation oder Reparaturprozessen erfolgt. *Maintenance*-CpG-Methylierung wird durch die DNA-METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) reguliert,

welche homolog zur DNA-Methyltransferase Dnmt1 in Säugern ist (Finnegan *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu reguliert die DNA-Methyltransferase CMT3 (CHROMOMETHYLASE 3) Cytosin-Methylierungen außerhalb von CpG-Motiven (Lindroth *et al.*, 2001; Cao und Jacobsen 2002). *CMT3*-Mutanten zeigen eine genomweite Abnahme der Methylierung in CpNpG-Sequenzen (Finnegan *et al.*, 2000), aber auch Reduktionen von asymmetrischer CpNpN-Methylierung an einigen Loci (Lindroth *et al.*, 2001). Neben der *maintenance*-Funktion von MET1 und CMT3 lassen einige Studien jedoch auch eine *de novo*-Aktivität vermuten (Aufsatz *et al.*, 2004; Malagnac *et al.*, 2002). DRMs (DOMAIN-REARRANGED METHYLTRANSFERASEs) haben eine große Homologie zu der Dnmt3-Familie der Methyltransferasen in Säugern. Sie besitzen *de novo*-Methyltransferaseaktivität und methylieren unmethylierte DNA an CpG, CpNpG und CpNpN-Sequenzen (Cao und Jacobsen 2002; Tariq *et al.*, 2004).

Die Etablierung von DRM-abhängiger *de novo*-Methylierung ist in Pflanzen auch unter dem Begriff der RNA-abhängigen DNA-Methylierung (RdDM) definiert und führt zum RNA-abhängigen transkriptionellen Gen-*Silencing* (Chan *et al.*, 2004; Mette *et al.*, 2000). RdDM wurde zuerst bei Virusinfektionen in Pflanzen beschrieben (Wassenegger *et al.*, 1994) und beruht sowohl auf der Synthese von Pol IV abhängigen siRNA-Vorläufertranskripten, welche zu siRNAs (*small interfering RNAs*) prozessiert werden, als auch auf der Synthese von Polymerase V abhängigen *long-noncoding-RNAs* (lncRNAs) (Daxinger *et al.*, 2009; Böhmendorfer *et al.*, 2014). Dabei transkribiert die RNA-Polymerase IV an spezifischen genomischen Loci einzelsträngige RNAs (ssRNAs). Diese Transkripte werden durch RDR2 (RNA-DEPENDENT RNA-POLYMERASE 2) in doppelsträngige RNAs (dsRNAs) konvertiert (Law *et al.*, 2011; Haag *et al.*, 2012). Die RNase III-like Ribonuklease DCL3 (DICER-LIKE 3) prozessiert die dsRNAs in 24-nt siRNAs, welche anschließend mit ARGONAUTE 4 (AGO4) assoziieren (Qi *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2008). Unabhängig von der siRNA-Biogenese werden von der RNA-Polymerase V (Pol V), unter Hilfe des DDR-Komplexes, lange nichtkodierende RNA-Transkripte (lncRNAs) synthetisiert. Der DDR-Komplex setzt sich aus DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1), DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) und RDM1 (REQUIRED FOR DNA METHYLATION 1) zusammen (Law *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass AGO4 über Basenpaarung mit der siRNA an die Pol V-Transkripte bindet (Wierzbicki *et al.*, 2008, 2009, 2012; Zheng *et al.*, 2013). Das Protein RDM1 aus dem DDR-Komplex bindet AGO4 sowie die *de novo* Cytosin-Methyltransferase DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) und rekrutiert den gesamten



Komplex zu den durch die Pol V transkribierten Regionen (Gao *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2013). Anschließend wird durch DRM2 die *de novo* DNA-Methylierung an homologen Zielsequenzen vermittelt (Cao und Jacobsen 2002; Naumann *et al.*, 2011). Das RNA-abhängige Gen-*Silencing* dieser Ziel-Sequenzen ist außerdem mit der Modifikation von Histonen verbunden (Bernatavichute *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

Pflanzen haben somit verschiedene *Silencing*-Mechanismen entwickelt, in denen *Silencing*-Faktoren in vielfältiger Weise agieren können. Unter anderem ist z.B. AGO4 an zwei RNA-abhängigen *Silencing*-Mechanismen involviert, posttranskriptionell durch Vermittlung des mRNA-Abbaus und transkriptionell durch Vermittlung von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen. Ebenso konnte für lange nichtkodierende RNAs am *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (Kim und Sung 2012) und an 5S-rDNA-Repeats (Douet *et al.*, 2009) gezeigt werden, dass sie auch unabhängig von siRNAs epigenetisches *Silencing* vermitteln können.

Im Laufe der Zeit wurden viele Modell-Systeme in verschiedenen Organismen etabliert, die zur Identifizierung dieser epigenetischen Faktoren, wie Histon-Methyltransferasen, Histon-Acetyltransferasen, DNA-Methyltransferasen, Chromatin-*Remodeling*-Faktoren und weiteren Komponenten dieser verschiedenen *Silencing*-Prozesse, geführt haben. Das älteste und wahrscheinlich auch sensitivste Modellsystem ist das Positioneffekt-Variation (PEV)-System von *Drosophila melanogaster*, bei dem infolge eines chromosomalen Rearrangements ein im Euchromatin lokalisiertes *white* (*w*)-Gen in die Nähe des perizentrischen Heterochromatins verlagert wird (Muller 1930; Tartof *et al.*, 1984). In Folge einer variablen Heterochromatisierung und damit verbundenen variierten Expression des *white* (*w*)-Gens kommt es zur Aupprägung von mosaikartigen rot-weiß gefleckten Augen im Vergleich zu roten Wildtypaugen. Auch in Hefen wurden ähnliche Phänomene durch variierte Expression von Genen in zentromernahen Bereichen bei *Schizosaccharomyces pombe* (Allshire *et al.*, 1994), als auch Telomerpositionseffekte bei *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Gottschling *et al.*, 1990).

Da in Pflanzen, mit Ausnahme von *Oenothera lamarckiana* (Catcheside 1938 und 1949), kein dem *Drosophila*-PEV-System vergleichbares *Silencing*-Phänomen identifiziert werden konnte, wurden zwei verschiedene transgene Systeme zur Analyse von transkriptionellem *Silencing* in *Arabidopsis* etabliert. Diese beruhen entweder auf Repeat-induziertem Gen-*Silencing* (RIGS) oder auf einem Zwei-Komponenten basierendem RNAi-abhängigen Gen-*Silencing*. Assaad und Signer konnten 1992 erstmals zeigen, dass Gen-*Silencing* durch die Anwesenheit von Sequenzwiederholungen (Repeats) induziert wird und durch ein Fehlen von

*Run-On*-Transkripten der inaktivierten Gene gekennzeichnet ist (Assaad *et al.*, 1993; Ye und Signer 1996). Mit dieser Erkenntnis wurden transgene *Silencing*-Systeme etabliert, die beispielsweise auf der Reaktivierung von transkriptionell inaktivierten, repetitiven Hygromycinphosphotransferase- (*HPT*)-Genen (Mittelsten Scheid *et al.*, 1998) oder multiplen Insertionen einer T-DNA mit *HPT*, *NPT* (*NEOMYCINPHOSPHOTRANSFERASE*) und einer *CHALKONSYNTHASE* (*CHS*) (Probst *et al.*, 2004) beruhen. Das auf zwei Komponenten basierte transgene System beruht wiederum auf der Synthese von doppelsträngiger Haarnadel-RNA, die zu siRNAs prozessiert wird und *Silencing* von homologen DNA-Sequenzen induziert (Aufsatz *et al.*, 2002).

Da die Isolation von neuen Mutanten für transkriptionelles Gen-*Silencing* die Verfügbarkeit eines geeigneten funktionellen Testsystems voraussetzt und die bisherigen verwendeten TGS-Testsysteme in Pflanzen nur schwer handhabbar und nicht ausreichend sensitiv waren, wurde ein neues *Silencing*-Testsystem auf der Basis transkriptionell inaktivierter transgener Reportergene etabliert (Hofmann 2004; Naumann *et al.* 2005). Das nicht auf Antibiotika-Resistenzen beruhende Testsystem basiert auf einer T-DNA, die entweder eine Einzelkopie des *35S::LUCIFERASE*-Transgens (Luc1) oder vier Kopien dieser Expressionskassette aus *35S*-Promotor, *LUCIFERASE*-Reportergen und einem *35S*-PolyA-Signal trägt (Luc2, Luc6, Luc7, Luc8, Luc9, Luc12). Zusätzlich ist zwischen den zwei Tandem-*LUC*-Repeats ein *NPT*-Gen inseriert und die Größe der kompletten *LUC*-T-DNA beträgt 11,7 kb. Aufgrund der repetitiven Anordnung der *LUC*-T-DNA sind die *LUCIFERASE*-Reportergene transkriptionell inaktiviert. Es konnten keine *Run-On*-Transkripte nachgewiesen werden (Hofmann 2004). Aus den mit dieser T-DNA transformierten Pflanzen wurden fünf Luc-Linien selektiert, die eine vollständige Transgeninaktivierung aufwiesen (Luc6, Luc7, Luc8, Luc9, Luc12). Zusätzlich wurde eine Linie mit stark reduzierter Transgenexpression isoliert (Luc2) (Hofmann 2004). FISH- und inverse PCR-Analysen belegen eine Einzelinsertion der T-DNA in den Linien Luc2, Luc7 und Luc9. In den Linien Luc6 und Luc12 konnten zwei bis drei T-DNA Insertionen nachgewiesen werden (siehe Tab. 2.2; A. Fischer, I. Hofmann, pers. Mitteilungen). Eine Ausnahme bildet die Linie Luc8, in welcher mehr als fünf T-DNA Insertionen detektiert werden konnten (A. Fischer, I. Hofmann, pers. Mitteilungen). Da die *Run-On*-Analysen *LUC*-Transkripte in der Luc8 nachwiesen und damit posttranskriptionelles Gen-*Silencing* vermuten ließen, wurde diese Linie nicht zur Mutantenselektion verwendet (Hofmann 2004).

Nach Mutagenisierung dieser Luc-Linien mit Ethylmethansulfonat (EMS) wurden Pflanzen mit visuell erhöhter Transgenexpression des *LUCIFERASE*-Reporters isoliert. Die niedrige

Nachweisgrenze und gute Quantifizierbarkeit des *LUCIFERASE*-Testsystems erlaubte auch die Isolation von Mutanten mit nur relativ schwacher oder organspezifischer Transgenreaktivierung (Hofmann 2004). Insgesamt wurden aus den Nachkommen 98 putative TGS-Suppressormutanten isoliert. Mit Hilfe von SSLP-Analysen (*Simple Sequence Length Polymorphism*) und *High-Resolution-Mapping* konnten die Mutationsorte in 34 Mutanten identifiziert werden, die insgesamt 27 verschiedene Gene betreffen (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Für sechs der betroffenen Gene wurden dabei mehrere Mutantenallele isoliert. Darunter wurden Mutationsorte in den Genen für bereits bekannte *Silencing*-Faktoren, wie die DNA-Methyltransferasen MET1 und CMT3 (Hofmann 2004; Fiedler 2007), für die Chromatin-*Remodeling*-Faktoren DDM1 (Hofmann 2004; Fiedler 2007) und DRD1 (Richter 2008), für die Histondeacetylase HDA6, für die große Untereinheit der RNA-Polymerase V (NRPE1) (Kummer 2010) und im *NRPD2a*-Gen identifiziert. Die zweitgrößte Untereinheit NRPD2a ist nicht nur eine Komponente des Pol V-Multienzymkomplexes, sondern auch die zweitgrößte Untereinheit der Polymerase IV (Pol IV) (Haag *et al.*, 2009).

Es wurden außerdem der gewebsspezifische Transkriptionsfaktor TTG2 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 2) (Hofmann 2004), das Kernprotein BRU1 (BRUSHY 1) (Hofmann 2004), die große Untereinheit der RIBONUKLEOTID-REDUKTASE RNR1 (Fiedler, 2007), der putative SWI/SNF-Chromatin-*Remodeling*-Faktor ATRX1 ( $\alpha$ -Thalassemia/*Mental Retardation X-linked*) (Meinel 2007), das in Fe/S-Cluster Assemblierung involvierte Protein AE7 (ASYMMETRIC LEAVES ENHANCER 7) (Gerschke 2011), die Serin/Threonin-Proteinkinase TSL (TOUSLED) (Heider 2011), die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase  $\alpha$  ICU2 (INCURVATA 2) (I. Hofmann, pers. Mitteilung) und MMS19 (I. Hofmann, pers. Mitteilung) als neue epigenetische Kontrollfaktoren identifiziert, die in transkriptionelle Gen-*Silencing*-Prozesse am *LUCIFERASE*-Transgen involviert sind.

Zur Aufklärung der epigenetischen Prozesse des transkriptionellen Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst epigenetische Modifizierungen und RNA-Transkripte am *LUC*-Locus in den verschiedenen Luc-Linien analysiert. Die Analyse des transkriptionellen Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat in den Luc-Linien ermöglichte anschließend eine vergleichende Analyse von Histon-Modifikationen und RNA-Transkripten in den isolierten *Silencing*-Suppressormutanten. Durch ChIP- und RT-PCR Analysen konnten neue Erkenntnisse zur Funktion der isolierten epigenetischen Kontrollfaktoren bei der Etablierung von Heterochromatin und transkriptionellem Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats gewonnen werden. Es sollte außerdem ein *in vivo*-Testsystems zur spezifischen Analyse von

Histonmodifizierungen der Histonvarianten in *Silencing*-Suppressorvarianten und zur Identifikation neuer Histonmodifikationen, die am heterochromatischen Gen-*Silencing* des *LUC*-Transgens beteiligt sind, entwickelt werden. Dazu wurden Histonfusionskonstrukte hergestellt, die in weiteren Arbeiten massenspektrometrische Analysen von Histonmodifizierungen in *Arabidopsis thaliana* ermöglichen sollen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme, Antikörper, Oligonukleotide

Die Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad sowie organische Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die Lösungen wurden mit Analysenwasser aus einer Reinstwasseraufbereitungsanlage (Milli-Qplus; Millipore, Schwalbach) angesetzt. Lösungen und Kunststoffmaterialien wurden vor der Verwendung in einem Dampfsterilisator (VarioklavO Typ 400) für 30 min bei 120-122 °C autoklaviert.

Von den Firmen Fermentas/Thermo Fisher Scientific (Schwerte) und Promega (Madison, USA) wurden Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und DNA-Polymerasen geliefert. Fotochemikalien von Kodak lieferte Sigma-Aldrich (Steinheim). Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, welche von Eurofins MWG-Operon (Ebersberg) synthetisiert wurden, befindet sich im Anhang. Antikörper wurden von den Firmen Abcam (Cambridge, UK), Merck Millipore (Darmstadt) und Invitrogen<sup>TM</sup>/Life Technologies (Darmstadt) bezogen.

**Tab. 2.1: Verwendete Antikörper für biochemische und immunozytologische Analysen**

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Konzentration ChIP	Konzentration <i>Western-Blot</i>	Konzentration Zytologie
H3K4me2	Abcam	Ab 32356	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3K4me3	Abcam	Ab 8580	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
	Abcam	Ab 1012	0,5 µg/100 µl		
H3K9ac	Abcam	Ab 10812	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3K9me2	Abcam	Ab 1220	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3K27me1	Upstate/jetzt Merck Millipore	07-448	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3K27me2	Upstate/jetzt Merck Millipore	07-452	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3K36me2	Upstate/jetzt Merck Millipore	07-274	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
H3	Abcam	Ab 1791	0,5 µg/100 µl	1:1000	-
V5	Invitrogen <sup>TM</sup> / Life technologies	46-0705	0,5 µg/100 µl	1:2000	1:1000
Alexa-488 GaM	Life technologies	A-11001	-	-	1:1000
GaR-HRP	Life technologies	G-21234	-	1:1000	-
GaM-HRP	Life technologies	G-21040	-	1:1000	-

## 2.1.2 Mikroorganismen

Als Wirtstamm für die zu klonierenden DNA-Fragmente wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli DH5 $\alpha$*  (Invitrogen<sup>TM</sup>/Life Technologies) verwendet. Zur Pflanzentransformation wurde der Bakterienstamm *Agrobacterium tumefaciens GV3101 pMP90* eingesetzt (Koncz und Schell 1986).

## 2.1.3 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde der pflanzliche Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Columbia* (Col-0) verwendet. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und bereits charakterisierten Mutantenlinien und transgenen Linien befindet sich in den Tabellen Tab. 2.2 und Tab. 2.3.

**Tab. 2.2: Verwendete Luc-Linien und Histonfusionslinien**

Interne Linienbezeichnung	Insertionsort der <i>LUC</i> -T-DNA	Referenz
Luc1	1 Insertion, Insertionsort unbekannt	Hofmann 2004
Luc2	1 Insertion, Chromosom 2, BAC –Klon F23F1, im 3'-UTR von <i>At2g30020</i>	Hofmann 2004
Luc6	2 Insertionen, eine bekannte Insertion auf Chromosom 3, BAC-Klon F21A14, im 3'-UTR von <i>At3g41768</i> (18SrRNA)	Hofmann 2004
Luc7	1 Insertion, Chromosom 1, BAC-Klon T27F4, intergenisch, 3,5 kb <i>downstream</i> von <i>At1g66340</i>	Hofmann 2004
Luc8	2 oder 3 Insertionen; Insertionsorte alle unbekannt	Hofmann 2004
Luc9	1 Insertion, Chromosom 3, BAC-Klon, F3A4, kurz vor dem 5'-UTR von <i>At3g50080</i>	Hofmann 2004
Luc12	2 oder 3 Insertionen, eine bekannte Insertion auf Chromosom 4, BAC-Klon T15B16, intergenisch, 600 bp <i>upstream</i> von <i>At4g01690</i>	Hofmann 2004
Interne Linienbezeichnung	Insertionsort der H3.1-T-DNA	Referenz
35S::H3.1-V5/His	Insertionsort unbekannt	Gläser 2010

Tab. 2.3: Verwendete *Silencing*-Suppressormutanten

Mutantenallel	Interne Linienbezeichnung	Genname	AGI Code	Mutierte Luc-Linie	Punktmutationen (Basen-Substitution, Triplett / Aminosäure (AS)-Substitution, Position)	Referenz
<i>ae7-h1</i>	6/10/3	<i>AE7</i>	AT1G68310	Luc6	Cytosin (C) zu Thymin (T), CTT→TTT Leucin (L) zu Phenylalanin (F), AS 107	Gerschke 2011
<i>tsl1-h1</i>	6/2/1	<i>TSL</i>	AT5G20930	Luc6	Guanin (G) zu Adenin (A), AGT→AAT Exon-Intron-Übergang, Nicht-Spleißen des 8. Introns führt zu frühzeitigem Stop-Codon	Heider 2011
<i>nripd2a-h3</i>	6/4/1	<i>NRPD2a</i>	AT3G23780	Luc6	Guanin (G) zu Adenin (A), TGG→TGA Tryptophan (W) zu Stop (#), AS 1012	I. Hofmann, pers. Mitteilung
<i>bru1-2</i>	6/8/1	<i>BRU1</i>	AT3G18730	Luc6	Guanin (G) zu Adenin (A), GGA→AGA Glycin (G) zu Arginin (R), AS 214	Hofmann 2004 Takeda <i>et al.</i> , 2004
<i>cm3-h1</i>	7/2/11	<i>CMT3</i>	AT1G69770	Luc7	Cytosin (C) zu Thymin (T), CCC→CTC Prolin (P) zu Leucin (L), AS 715	Fiedler, 2007
<i>met1-h1</i>	7/4/4	<i>MET1</i>	AT5G49160	Luc7	Guanin (G) zu Adenin (A), GAG→AAG Glutaminsäure (E) zu Lysin (K), AS 1272	Fiedler 2007
<i>icu2-h1</i>	7/6/2	<i>ICU2</i>	AT5G67100	Luc7	Guanin (G) zu Adenin (A), GAT→AAT Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N), AS 1121	I. Hofmann, pers. Mitteilung
<i>nripe1-h2</i>	7/6/3	<i>NRPE1</i>	AT2G40030	Luc7	Cytosin (C) zu Thymin (T), CCG→CTG Prolin (P) zu Leucin (L), AS 416	Kummer 2010
<i>mms19-h1</i>	7/7/1	<i>MMS19/ MET18</i>	AT5G48120	Luc7	Cytosin (C) zu Thymin (T), CAG→TAG Glutamin (Q) zu Stop (#), AS 724	I. Hofmann, pers. Mitteilung
<i>nripe1-h3</i>	7/8/3	<i>NRPE1</i>	AT2G40030	Luc7	Guanin (G) zu Adenin (A), TGG→TGA Tryptophan (W) zu Stop (#), AS 1050	I. Hofmann, pers. Mitteilung
<i>nripd2a-h1</i>	7/10/5	<i>NRPD2a</i>	AT3G23780	Luc7	Guanin (G) zu Adenin (A), TGG→TGA Tryptophan (W) zu Stop (#), AS 229	Kummer 2010
<i>ddm1-h1</i>	9/2/1	<i>DDM1</i>	AT5G66750	Luc9	Cytosin (C) zu Thymin (T), CAG→TAG Glutamin (Q) zu Stop (#) (AS 460)	Fiedler 2007
<i>tig2-h1</i>	9/2/5	<i>TTG2</i>	AT2G37260	Luc9	Guanin (G) zu Adenin (A), TGG→TGA Tryptophan (W) zu Stop (#), AS 122	Hofmann 2004
<i>atr1-h1</i>	9/7/4	<i>ATRX</i>	AT1G08600	Luc9	Cytosin (C) zu Thymin (T), ACC→ATT Threonin (T) zu Isoleucin (I), AS 1257	Meinel 2007
<i>hda6-h1</i>	9/8/1	<i>HDA6</i>	AT5G63110	Luc9	Guanin (G) zu Adenin (A), GGG→AGG Glycin (G) zu Arginin (R), AS 171	Thümmler 2004
<i>rnr1-h1</i>	12/1/3	<i>RNR1</i>	AT2G21790	Luc12	Guanin (G) zu Adenin (A), CAG→TAG Alanin (A) zu Threonin (T), AS 763	Fiedler 2007
<i>nripe1-h1</i>	12/2/2	<i>NRPE1</i>	AT2G40030	Luc12	Guanin (G) zu Adenin (A), CAG→CAA Verschiebung des Exon-Intron-Übergangs um 21 Nukleotide (Δ AS 1040-AS 1046)	Kummer 2010
<i>drd1-h1</i>	12/2/77	<i>DRD1</i>	AT2G16390	Luc12	Guanin (G) zu Adenin (A), GGA→GAA Glycin (G) zu Glutaminsäure (E), AS 494	Richter 2008

### 2.1.4 Sequenzen

Verwendete DNA- und Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* wurden von der TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*)-Datenbank geladen (<https://www.arabidopsis.org>, TAIR10, Stand Oktober 2014).

### 2.1.5 Vektoren

In der nachfolgenden Tab. 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit ihren wichtigsten Merkmalen, die Angaben zur Verwendung und die Referenz aufgelistet. Die verwendeten Vektoren sind zusätzlich im Anhang in der Abbildung 7.6 graphisch dargestellt.

Tab. 2.4: Verwendete Vektoren

Vektor	Merkmale	Verwendung / Referenz
<b>pGEM<sup>®</sup>-T</b>	Amp <sup>r</sup> , MCS, LacZ, T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promoter, 3'-T Überhang	Klonierungsvektor / Promega (Madison, USA)
<b>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</b>	Amp <sup>r</sup> , MCS, LacZ, T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promoter, 3'-T Überhang	Klonierungsvektor / Promega (Madison, USA)
<b>pAc5.1/V5-His A</b>	Amp <sup>r</sup> , MCS, V5-Epitop-Tag, 6xHis-Tag	Expressionsvektor für Fusionsproteine / Life Technologies GmbH (Darmstadt)
<b>pRT100</b>	Amp <sup>r</sup> , MCS,	Herstellung von Expressionskassetten
<b>pRT101</b>	CaMV-35S-Promotor, CaMV-35S-Poly-A	mit CaMV-35S-Promotor für die Pflanzentransformation / (Töpfer, 1987)
<b>pCB302</b>	Kan <sup>r</sup> , MCS, T-DNA, BAR	Binärvektor zur Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / (Xiang <i>et al.</i> , 1999)

### 2.1.6 Anzucht des pflanzlichen Materials

Zur Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* wurde ein Gemisch aus 3 Teilen ED Koko-Einheitserde (Einheitserde- und Humuswerke GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa) und 1 Teil Vermiculite (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt) verwendet. *Arabidopsis* wurde unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht bei 23°C sowie 16 Stunden Dunkelheit bei 20°C sowie



einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %) angezogen. Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) gehalten.

### **2.1.7 Bakterielle Nährmedien**

Zur Vermehrung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* wurde LB-Flüssigmedium und LB-Agar verwendet. Zur Selektion von Plasmiden wurde den Medien das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) hinzugefügt. Eine Selektion von Rekombinanten nach der Klonierung erfolgte auf LB-Agar Platten, denen zusätzlich zum Antibiotikum noch X-Gal (20 mg/ml, Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben wurde. Zur Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* wurde den Medien Rifampicin (100 µg/ml), Gentamycin (10 µg /ml) und Kanamycin (50 µg /ml) hinzugefügt.

## **2.2 Angewandte Methoden**

### **2.2.1 Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana***

Die Isolation von DNA aus Pflanzenblättern erfolgte nach der Methode von Brandstädter (Brandstädter *et al.*, 1994). Dazu wurden etwa fünf frische Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem gekühlten Glasstab gemörsert und mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM Natriumchlorid, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1,5% SDS) homogenisiert. Der Ansatz wurde anschließend im Heizblock bei 65°C für 10 min erhitzt und nach Zugabe von 300 µl essigsaurer Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure) für 10 min bei 4°C inkubiert. Zur Abtrennung größerer Zellbestandteile erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 20000 rpm. Der flüssige Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 300µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-25:24:1-Gemisch zugegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase wieder in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 500 µl Isopropanol für 20 min bei -20°C und durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 20000 rpm. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol für 5 min bei 20000 rpm gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für 1 h bei 37°C getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 100 µg/ml RNase A aufgenommen.

### 2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Isolation der Plasmide aus *E.coli* wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Dazu wurde 2 ml LB-Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei 4500 rpm für 10 min pelletiert und in 200 µl P1 Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (200 mM NaOH; 1% SDS) und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Es wurde 200 µl P3-Puffer (2,8 M Na-Acetat; pH 5) zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol gefällt und für 30 min bei 13000 rpm pelletiert. Danach wurde das erhaltene Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

### 2.2.3 Isolation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden 50-100 mg Blattmaterial in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Glasstab gemörsert. Anschließend wurde 1 ml des auf 60°C vorgewärmten TRIzol® (Invitrogen GmbH/Life Technologies) oder der alternativen TRIZOL-Reagenz [38% saures, wassergesättigtes Phenol; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Na-Acetat pH 5,0; 5 % Glycerin] dazu gegeben und gevortext, bis eine homogene Lösung vorliegt. Danach erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min bei 60°C im Thermoblock. Die Proben wurden erneut gemischt und für mindestens 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert, um sämtliche Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol dazu gegeben, gevortext und für 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70 %-igem Ethanol versetzt und 5 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min unter einem Abzug getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und

für 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) und die Visualisierung in einem 1 %-igen TBE-Gel. RNA-Proben wurden bei -80° C gelagert.

#### **2.2.4 Isolation und Nachweis von doppelsträngiger RNA aus *Arabidopsis thaliana***

Zur Isolation von doppelsträngiger RNA wurde das Protokoll zur Isolation von Gesamt-RNA mittels Trizol modifiziert. Sämtliche Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Nach dem Mörsern von 50-100 mg Blattmaterial in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff wurde 1 ml eiskaltes Trizol (Invitrogen GmbH/Life Technologies) dazu gegeben und gevortext, bis eine homogene Lösung vorliegt. Danach erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min auf Eis. Die Proben wurden erneut gemischt und für mindestens 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert um sämtliche Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde 2 min bei RT inkubiert, und anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und gevortext. Danach erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol dazu gegeben, gevortext und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol versetzt, 5 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert und das Pellet für 10 min unter einem Abzug getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) und die Visualisierung in einem 1%-igen TBE-Gel.

Danach erfolgte ein DNase- und RNase-Verdau zur Entfernung von DNA und einzelsträngiger RNA. Dazu wurde 10 µg RNA mit 2 µl RQ1-Puffer, 10 µl RQ1-DNase (Promega) und 0,1 µl RNase A (20 mg/ml) (Invitrogen/ Life Technologies) in einem 20 µl Ansatz gemischt und für 30 min bei 37°C verdaut. Zur Entfernung von RNAsen und DNAsen wurde der Verdau mit 180 µl H<sub>2</sub>O und 200µl ROTI®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für mindestens 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 200 µl Chloroform zugegeben und gevortext. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol dazu gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol versetzt, 5 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert und für 5 min unter einem Abzug getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Zur cDNA-Synthese wurde 1 µg mit DNase und RNaseA verdauter RNA mit dem QuantiTect-Reverse Transcription-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben revers synthetisiert. RNA-Proben wurden bei -80° C gelagert.

### 2.2.5 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und Real-Time-PCR

Es wurde 1 g Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* gesammelt und zweimal mit 40 ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Blätter in 37 ml einer 1 % Formaldehydlösung (1 % Formaldehyd, 0.4 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM PMSF, ½ Tablette Proteaseinhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) aufgenommen. Die Protein-DNA-Vernetzung erfolgte für 10 min in einem Vakuumexsikkator. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 ml 2 M Glycin unter Vakuum 5 min abgestoppt und das Blattmaterial anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Chromatinisolation wurde das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem Mörser pulverisiert und in 30 ml eiskaltem Extraktionspuffer 1 (0.4 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM PMSF, ½ Tablette Proteaseinhibitor) durch Vortexen resuspendiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Lösung wurde durch drei Lagen Miracloth (Calbiochem/Merck Millipore) gefiltert und bei 4000 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer 2 (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM PMSF, Proteaseinhibitor) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und 4°C für 10 min. Die Aufnahme der Pellets erfolgte in 300 µl Extraktionspuffer 2. In einem neuen Eppendorfgefäß wurde 300 µl eiskalter Extraktionspuffer 3 (1,7 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 % Triton X-100, 5 mM β-Mercaptoethanol, Proteaseinhibitor) vorgelegt, diese mit dem resuspendierten Pellet überschichtet und die Zellkerne für 1 h bei 13000 rpm in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die Lyse der erhaltenen Zellkerne erfolgte in 540 µl eiskaltem Zellkern-Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl

pH 8, 10 mM EDTA, 1 % SDS, Proteaseinhibitor) für 20 min auf Eis. Anschließend erfolgte zum Aufschluss eine Ultraschallbehandlung für 4 mal 15 sec bei 20 % Power (Bandelin Sonoplus, Berlin). Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer zweimal für 10 min bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein Sarstedtröhrchen überführt und die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Jeweils vor und nach dem Ultraschall wurden jeweils 20 µl der Chromatinlösung zur Überprüfung der Ultraschallbehandlung abgenommen. Das Lösen der Chromatin-Protein-Vernetzung in den Ultraschall-Kontrollproben erfolgte durch Zugabe von 0,8 µl 5 M NaCl und Inkubation bei 65°C über Nacht auf dem Heizblock. Am nächsten Tag erfolgte ein Verdau der Proteine durch Zugabe von 164 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Proteinase K (20 mg/ml), 5 µl 0,5 M EDTA und 10 µl von 1 M Tris-HCl pH 6,5 für 3 h bei 45°C. Die Proben wurden anschließend auf ein 1 % TAE-Gel aufgetragen und die Sonifizierungseffizienz von einem Durchschnitt von 500 bp kontrolliert. Nach positiver Ultraschallkontrolle wurde das Volumen der Proben bestimmt. Zur Verdünnung der SDS-Konzentration wurde der Ansatz entsprechend des ermittelten Volumens mit eiskaltem *Dilution*-Puffer (1,1 % Triton X-100, 1,2 M EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl) 1:10 verdünnt. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Vorbehandlung der Chromatinlösung durch Zugabe von 120 µl ProteinG-Sepharose-4-FastFlow-*Beads* (GE Healthcare) und anschließender Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Drehinkubator. Vor der Verwendung der ProteinG-Sepharose-*Beads* wurden diese dreimal mit 3 ml Verdünnungspuffer gewaschen. Nach Abzentrifugation der *Beads* in der Chromatinlösung für 30 sec bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein neues Sarstedtröhrchen überführt. Ein 900 µl Aliquot wurde abgenommen und als Input bei -20°C eingefroren. Je 900 µl der Chromatinlösung wurde in Eppendorfgefäßen aliquotiert und mit 10 µg Antikörper versetzt. Ein Ansatz ohne Antikörper wurde als Mock-Kontrolle mitgeführt. Die Bindung der Antikörper an die Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Drehinkubator. Die Bindung der Immunkomplexe an 60 µl ProteinG-Sepharose 4 Fast Flow-*Beads* erfolgte für 3 h bei 4°C. Anschließend wurden die *Beads* bei 5000 rpm und 4°C für 30 sec sedimentiert und je 1 mal mit 1 ml Waschpuffer LS (150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), Waschpuffer HS (500 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), Waschpuffer LiCl (0.25 mM LiCl, 1 % Nonidet P-40, 1 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) und zweimal mit 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) für je 10 min bei 4°C auf dem Drehinkubator gewaschen. Die *Beads* wurden zwischen den Waschschrritten bei 5000 rpm für 30 sec bei 4°C abzentrifugiert. Die Elution der Immunkomplexe erfolgte durch zweimalige Zugabe von 250 µl 65°C warmen

Elutionspuffers und anschließender 15 minütiger Inkubation bei 750 rpm und 65°C auf einem Thermoschüttler (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf). Die *Beads* wurden bei 13000 rpm für 30 sec sedimentiert und die beiden Überstände in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die am Vortag isolierte 900 µl Inputkontrolle wurde mit 460 µl Elutionspuffer versetzt. Das Lösen der Chromatin-Protein-Vernetzung erfolgte durch Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und Inkubation bei 65°C über Nacht auf dem Heizblock. Am nächsten Tag erfolgte ein Verdau der Proteine durch Zugabe von 1 µl Proteinase K (20 mg/ml), 10 µl 0,5 M EDTA und 20 µl von 1 M Tris-HCl pH 6,5 für 2 h bei 45°C. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Nucleospin-Extract II-Kit (Macherey&Nagel, Düren) und Aufnahme in 100 µl EB-Puffer. Zur Amplifikation der präzipitierten DNA-Fragmente wurde quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) in einem iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Dazu wurde in einem 20 µl Ansatz 10 µl IQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad), 0,3 µM Primer und 5 µl der immunopräzipitierten DNA pipettiert. Die Input-DNA enthält die zur Immunopräzipitation eingesetzte Ausgangsmenge an Gesamtchromatin und wurde auf 100 % gesetzt. Zur Ermittlung von %-Inputwerten in den immunopräzipitierten Proben wurden deshalb Standardkurven mit Verdünnungen von 0.12 %, 0.06 %, 0.03 %, 0.015 %, 0.0075 % und 0.00375 % von der Input-DNA jeder Probe hergestellt. Damit wurde der %-Wert relativ zur Input-DNA für jede präzipitierte Probe ermittelt. Für jede Probe wurden zwei technische Wiederholungen in der qPCR aufgetragen. Zur Kontrolle der Primerspezifität wurden im Anschluss Schmelzkurvenanalysen durchgeführt und die Produkte sequenziert. Die Menge des Amplifikationsproduktes korreliert dabei mit der Menge der untersuchten Histonmodifizierung an der Zielsequenz. Als CHIP-Kontrolle für Hintergrundsignale wurde jeweils eine Chromatinprobe ohne Zugabe eines Antikörpers (Mock-Probe) mitgeführt und erhaltene Inputwerte in der Mock-Probe nach der *Real-Time*-PCR von den Inputwerten der Proben mit Antikörperzugabe abgezogen. Die Inputwerte für die Mock-Kontrolle waren immer sehr niedrig und hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse der *Real-Time*-PCR.

### 2.2.6 Statistische Analysen

Zur Analyse der Gleichheit von Mittelwerten wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Damit wurde überprüft, ob die gefundenen Unterschiede in den CHIP-Ergebnissen statistisch signifikant sind. Als Signifikanzniveau wurde die 5 %-Marke ( $p < 0,05$ ) gewählt. Die verwendeten Abstufungen sind in der Tabelle 2.5 aufgelistet.

**Tab. 2.5: Einteilung des Signifikanzniveaus**

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbol
$p \geq 0,05$	nicht signifikant	
$P < 0,05$	signifikant	*
$P < 0,01$	sehr signifikant	**
$P < 0,005$	höchst signifikant	***

### 2.2.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von DNA- und cDNA-Abschnitten erfolgte mittels PCR unter Verwendung von *Taq*- und *Pfu*-DNA Polymerasen laut Herstellerangaben (GoTaq® DNA Polymerase, Promega).

### 2.2.8 Semiquantitative RT-PCR

Zur RT-PCR-Analyse wurde 1 µg RNA mit dem QuantiTect-Reverse Transcription-Kit (Qiagen) unter Verwendung des im Kit enthaltenen *random*-Hexamer-Primern laut Herstellerangaben revers transkribiert. Zur strangspezifischen cDNA-Synthese wurden Gen-spezifische *forward*-Primer oder *reverse*-Primer verwendet. Polyadenylierte mRNA wurde unter Verwendung eines *anchored* Oligo-dT-Primer (Thermo Fisher Scientific) mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) transkribiert. Da im RevertAid Kit kein genomischer DNA-Verdau Schritt enthalten ist, wurde die RNA zuvor mit RQ1 RNase-freier DNase (Promega) laut Herstellervorgaben behandelt. Zur Kontrolle auf Abwesenheit von genomischer DNA (gDNA) im RNA-Ansatz wurde für jede Probe eine Kontrollprobe ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (-RT) mitgeführt. Die anschließende PCR erfolgte in einem 25 µl Ansatz unter der Verwendung der GoTaq® DNA Polymerase (Promega) für 32 Zyklen (*random*-cDNA), 35 Zyklen (PolyA-cDNA) oder 40 Zyklen (Gen-spezifische cDNA). Die PCR-Produkte wurden in 1,5 %-igen Agarose-Ethidiumbromid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem UV-Transilluminator unter Verwendung einer INTAS-Software (INTAS Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen) dokumentiert. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte eluiert, in pGEM®-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert, um die Sequenzspezifität der PCR-Produkte zu überprüfen.

### **2.2.9 Analyse von 5'-Enden von cDNAs (5'-RACE-PCR)**

Zur Analyse von 5'-Enden von cDNAs wurde das GeneRacer®-SuperScript® III Reversen Transkriptase-Kit verwendet. Mit diesem Kit können nur Vollängen-Transkripte amplifiziert werden durch Elimination von verkürzten RNA-Fragmenten. Die RNA wurde gemäß Herstellerangaben behandelt und in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation der cDNA wurde GoTaq® DNA Polymerase (Promega) verwendet. Ein Teil des ersten PCR-Ansatzes wurde zur Durchführung einer *nested*-PCR verwendet. Die PCR-Ansätze wurde auf ein 1,5 %-iges TAE Agarosegel aufgetragen, erhaltene Banden eluiert, in einen pGEM®T-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die Analyse der 5'-Enden erfolgte durch Sequenzvergleiche mit dem Programm BioEdit *Sequence Alignment Editor* (Hall 1999).

### **2.2.10 Kolonie-PCR**

Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde direkt nach der Transformation in *E. coli* an den Transformanten eine Kolonie-PCR zum Test auf das Vorhandensein des gewünschten Fragments durchgeführt. Dazu wurde die Kolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agar-Platte gepickt und in den PCR-Ansatz getaucht.

### **2.2.11 Restriktion mit Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von DNA wurde in einem 20 µl Ansatz mit 1 µl des jeweiligen Enzyms zu den nach dem Hersteller vorgegebenen Pufferbedingungen mit 5-10 µl der zu schneidenden DNA durchgeführt. Die Restriktion erfolgte bei 37°C für 1 h.

### **2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Die mittels *Taq*-Polymerase in einer PCR amplifizierten und eluierten DNA-Fragmente wurden in den linearisierten Vektor pGEM®-T des pGEM®-T *Vector System I*-Kit von Promega (Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers ligiert. Zur Herstellung von Histonfusionskonstrukten wurden die mittels *Pfu*-Polymerase amplifizierten Histon-DNA-Fragmente über die endständig eingefügten Restriktionsschnittstellen in den Vektor *pAc5.1-V5/His A* kloniert, welcher zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert wurde.



### 2.2.13 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit Konzentrationen von 1 % - 1,5 % in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,8, 2 mM EDTA). Zum Anfärben der DNA wurde dem Agarosegel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Stopppuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 120 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % [w/v] Orange G) versetzt. Als Größenstandart wurde eine 100 bp DNA-Leiter oder eine 1 kb-DNA-Leiter verwendet. Zur Fotodokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden ein UV-Transilluminator in Kombination mit einem Kamerasystem (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) und einem Fotodrucker (Mitsubishi, Ratingen) verwendet.

### 2.2.14 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Amplifikation wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Verwendung des DNA-Extraktionskits QIAEX-II (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

### 2.2.15 Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse nach Sanger (1977) wurden die zu sequenzierenden DNA-Proben zunächst in einer PCR zur Amplifikation der spezifischen DNA-Region eingesetzt. Hierzu wurden 1 µl DNA und jeweils 2 µl des spezifischen *forward*- bzw. *reverse*-Primers mit dem Big-Dye® Terminator v1.1 *Cycle Sequencing*-Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben in einem 10 µl Ansatz verwendet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und die DNA mittels Ethanolfällung präzipitiert. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit einem ABI PRISM 377 DNA *Sequencer* (Applied Biosystems, Darmstadt).

### 2.2.16 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen von *Escherichia coli DH5α* (Invitrogen, Karlsruhe) im Eisbad aufgetaut und 5 µl des Ligationsansatzes dazugegeben. Nach Inkubation der Zellen für 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Nach 2 min auf Eis wurden 250 µl LB-Medium dazu pipettiert und die Zellen 1 h bei 37°C und 180 rpm auf einem Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde der

Ansatz zur Selektion der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit den jeweiligen Selektionsmarkern ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.17 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens***

Es wurden 2 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA mit 20 µl kompetenter Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in flüssigem Stickstoff für 5 min eingefroren und in einem Wasserbad für 5 min bei 37°C hitzegeschockt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte die Kultivierung der Zellen für 2-4 h bei 28°C auf dem Schüttelinkubator bei 160 rpm. Zur Reduktion des Flüssigkeitsvolumen wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 2300 rpm sedimentiert und der Überstand bis auf etwa 150 µl abgenommen und verworfen. Im verbliebenen Medium erfolgte die Resuspension der Zellen, welche zur Selektion auf LB-Agar-Platten mit Rifampicin (100 µg/ml), Gentamycin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und bei 28°C für wenigstens 48 h inkubiert wurden.

### **2.2.18 Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* nach der Blütentauchmethode (*floral dip*) von Clough und Bent (1998). Dazu wurden die zu transformierenden Kolonien in 2 ml LB-Medium (mit Rifampicin 100 µg/ml, Gentamycin 10 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml) über Nacht bei 28°C auf dem Schüttelinkubator bei 160 rpm herangezogen und am Folgetag in 200 ml LB-Lösung überführt, deren Kultivierung erneut über Nacht zu gleichen Bedingungen erfolgte. Die Bakterienzellen wurden anschließend für 10 min bei 5000 rpm sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes in 30 ml 5 %-iger Saccharose-Lösung mit 0,02 % Silwet L-77 aufgenommen. Die zu transformierenden Pflanzen befanden sich kurz vor der Blütephase. Es wurden für jeden Transformationsansatz 10 Pflanzen behandelt. Durch Tauchen der Blütenstände und der Blattrosetten in die Zellsuspension wurden diese benetzt. Nach einer Dunkelperiode von 24 h wurden die Pflanzen bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 23°C; 8 h Dunkelheit, 20°C; relative Luftfeuchtigkeit 60 %) angezogen.

### **2.2.19 Histonpräparation aus *Arabidopsis thaliana***

Zur Präparation von Histonen aus *Arabidopsis thaliana* wurde die Methode von Houben (Houben *et al.*, 2003) verwendet. Dazu wurde 1 g Blattmaterial in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 4 ml eiskaltem Histon-Extraktionspuffer (20 mM

HEPES pH 7,9; 400 mM Saccharose; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 0,1 % TritonX-100; 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>-Natriumazid; 1,5 mM PMSF; 1 mM DTT) in ein Greiner-Röhrchen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (zweimal 10 sec bei 50 % Power, Sonopuls, BANDELIN, Berlin). Nach Zugabe von 4 ml 0,4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Präparation 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 1400 rpm/4°C abzentrifugiert. Die obere Phase wurde nach Überführung in ein neues Greiner-Röhrchen mit 2,5 ml Methanol/Chloroform (1:1) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut 10 min bei 1400 rpm/4°C zentrifugiert. Die präparierten Histone befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die Ober- und Unterphase wurde abgegossen. Das erhaltene Interphasenpellet wurde mehrfach mit 5 ml eiskalter 80 % Acetonlösung gewaschen, bis sich das Pellet weiß färbte. Das Pellet wurde 15 min bei RT getrocknet und in 500 µl Roti-Load (ROTH, Karlsruhe) aufgenommen.

### 2.2.20 Gelelektrophorese von Histonen (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Tab. 2.6: Verwendete Lösungen und Konzentrationen für SDS-Polyacrylamid-Gele

Lösungsmittel	15 % Sammelgel	5 % Trenngel
Wasser	2,3 ml	2,1 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	5 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,38 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,03 ml
10 % APS	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml

Die Histonproben wurden für 3 min bei 95°C erwärmt und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (Tab. 2.6) aufgetragen. Die Auftrennung der Histone erfolgte bei 45 mA/300 V in Laufpuffer (0,025 M Tris; 0,1 % SDS; 0,192 M Glycin). Die Visualisierung von Proteinen erfolgte durch Anfärbung des Gels in Coomassielösung (50 % Methanol; 40 % H<sub>2</sub>O; 10 % Essigsäure; 0,25 % Brilliant Blue R 250, SIGMA).

### 2.2.21 Aufreinigung von V5/His-Fusionshistonen unter denaturierenden Bedingungen

Die Methode zur Isolation und Aufreinigung von Histonen im großen Maßstab wurde von D. Demidov (IPK, Gatersleben) etabliert. Dazu wurde Blattmaterial mit Hilfe von Stickstoff

fein gemörsert und mit  $\frac{1}{10}$  Volumen von 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 3 Tabletten Proteaseinhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) versetzt. Die Lösung wurde 4 h bei 4°C rührend inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte nach 1 h mittels Ultraschall (einmal 30 sec bei max. Power, Sonopuls, BANDELIN, Berlin). Anschließend wurde die Lösung durch zwei Lagen Miracloth filtriert und 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Lösung wurde in ein Becherglas überführt und  $\frac{1}{25}$  Volumen Tris-HCl pH 8 zugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von konz. Ammoniaklösung bis zu einem pH-Wert von 8. Es wurde dann solange Ammoniumsulfatpulver hinzugefügt und bei RT gerührt, bis sich am Boden durch Sättigung Kristalle bildeten. Die Lösung wurde dann bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen, 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Puffer 1 pH 8 (8 M Harnstoff, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME, 10 % Glycerin und 0,5 % TritonX-100) gelöst. Der Überstand wurde für 10 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, mit 100  $\mu$ l äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden) versetzt und für 1-2 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde anschließend zweimal mit 5 ml Puffer 1 pH 8 und einmal mit 5 ml Puffer 1 pH 6 gewaschen. Die Ablösung der V5/His-Histone von der Ni-NTA-Agarose erfolgte in einem absteigendem pH-Gradienten mit je 100  $\mu$ l Puffer 1 pH 5,3; 100  $\mu$ l Puffer 1 pH 4 und 100  $\mu$ l Puffer 1 pH 2,8. Nach Zugabe von jeder Elutionslösung wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Agarose bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die drei Elutionsfraktionen wurden anschließend zur Analyse mittels *Western-Blot* verwendet.

### 2.2.22 Immunozytologischer Nachweis von V5/His-Fusionshistonen

Ein junges Rosettenblatt von *Arabidopsis thaliana* wurde in einem Eppendorfgefäß mit 300  $\mu$ l eiskalter Fixierlösung (Methanol/Essigsäure 3:1) für 30 min auf Eis inkubiert. Das Blatt wurde anschließend für 15 min in 500  $\mu$ l Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer (0,01 M Zitronensäure-monohydrat; 0,01 M Tri-Natriumcitrat-2-hydrat; pH 4,8) bei Raumtemperatur gewaschen. Der Verdau der Zellwände erfolgte in 100  $\mu$ l Cellulase/Pektinase-Puffer (2 % Cellulase; 2 % Pektinase in Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer) für 1 h bei 37°C. Nach erneutem Waschen in 500  $\mu$ l Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer wurde der Puffer bis auf 50  $\mu$ l entfernt, das Blatt im verbleibenden Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer suspendiert und auf einen mit Poly-L-Lysin (0,1 % w/v Poly-L-Lysin in Wasser, Sigma-Aldrich, Steinheim) beschichteten Objektträger übertragen. Die

Zellsuspension wurde mit zwei Tropfen 45 %-iger Essigsäure vermischt, mit einem Deckglas bedeckt und das Präparat für 1 min in Trockeneis eingefroren. Nach Abschneiden des angefrorenen Deckglases wurde das Präparat bei 60°C auf einer Heizplatte (Störktronic, Stuttgart) für 2-3 min getrocknet und in einer Küvette mit 1xPBS (137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 4,3 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat; 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat) für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Das *Blocking* des Präparats erfolgte 1 h bei 37°C in 20 µl 1 % Milchpulver/1xPBS. Dazu wurde das Präparat mit Folie abgedeckt und in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 20 µl primäre Antikörperlösung (1:50 Verdünnung mit 1 % Milchpulver/1xPBS) zugegeben, mit Folie bedeckt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Präparat wurde für 15 min in 1xPBS gewaschen und anschließend ein an einen Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 488) gekoppelter sekundärer Antikörper aufgetropft (20 µl einer 1:100 Verdünnung in 1 % Milchpulver/1xPBS). Nach erneutem Waschen für 15 min in 1xPBS wurde 20 µl DAPI [1 ml McIlvaine's Puffer pH 7 (0,1 M Zitronensäure, 0,2 M di-Natriumhydrogenphosphat), 400 µl DAPI-Stammlösung (100 µg/ml), 500 µl Glycerin] aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte in einer lichtundurchlässigen Kassette bei 4°C. Der Fluoreszenznachweis erfolgte unter dem Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit einem gekoppelten Kamerasystem (Visitron Systems, Puchheim).

### **2.2.23 Immunozytologischer Nachweis von Proteinen im *Western-Blot***

Nach Auftrennung im Gel wurden die Histone auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porenweite, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) transferiert. Dazu wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese in einer Tank-Blot-Apparatur (Bio-Rad, München) zusammen mit der Membran eingespannt und bei 100 V und 4°C in vorgekühltem Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) für 1 h geblottet. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0,2 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure) für 5 min angefärbt und mit Wasser entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer der Proteine zunächst für 1 h mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA)/TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) bzw. mit 3 % Milch/TBST auf einem Taumelschüttler bei RT geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation in primärer Antikörperlösung (1:1000 in 3 % BSA/TBST; TUBULIN-Antikörper 1:5000 in 3 % Milch/TBST) für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde für 3 mal 15 min in TBST auf dem Taumelschüttler gewaschen. Die Inkubation in sekundärer

Antikörperlösung (PEROXIDASE-konjugierter Antikörper GaM (*Mouse*) oder GaR (*Rabbit*) 1:2000 in 3 % BSA/TBST) erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal 15 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde der ECL-*Western* Kit (GE Healthcare, Solingen) gemäß Herstellervorgaben verwendet. Die Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (X-Ray HR-E, Fujifilm, Düsseldorf) erfolgte in einer lichtdichten Metallkassette. Anschließend wurden die Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar und dauerhaft fixiert (Kodak Entwickler-und Fixierlösung, Sigma-Aldrich, Steinheim).

#### **2.2.24 Basta<sup>®</sup>-Selektion von positiv transformierten Pflanzen**

Zur Selektion von positiven Transformanten, welche das *BAR*-Gen der T-DNA des pCB302-Vektors als Resistenzmarker und damit eine Basta<sup>®</sup>-Resistenz tragen, erfolgte nach Aussaat der Samen auf Erde im Stadium der Keimblätter ein Besprühen der Pflanzen mit einer 1:3000 Verdünnung des Herbizids Basta<sup>®</sup> (Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Frankfurt). Die Behandlung wurde nach 2 Tagen und nach 5 Tagen wiederholt. Die Kultivierung des Saatguts erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 23°C; 16 h Dunkelheit, 20°C; relative Luftfeuchtigkeit 60 %).

#### **2.2.25 Messung der Luciferaseaktivität**

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in transgenen Pflanzen erfolgte *in vivo* mit einem Kamerasystem (Hamamatsu Photonic Deutschland GmbH, Herrsching) unter Verwendung der firmeneigenen Argus 50-Software. Die Pflanzen wurden mindestens 10 min vor Messungsbeginn mit 1,3 mM Luciferinlösung (Molecular Probes, USA) besprüht. Bei der Messung wurden die emittierten Photonen mit einer CCD-Kamera erfasst und die detektierten Photonendichten in Form von Falschfarbenbildern dargestellt. Eine weiße Farbe auf den Falschfarbenbildern symbolisiert dabei hohe und dunkelblau niedrige Photonendichten. Die Sensitivität der Kamera wurde auf einer Skala von 0 bis 10 bei allen Messungen auf den Wert 7 eingestellt.

#### **2.2.26 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana***

Zur Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* wurden Pflanzen mit ungeöffneten Blütenknospen verwendet. Einzelne geöffnete Blüten wurden vor und während der Kreuzungstage regelmäßig entfernt, um eine Selbstbefruchtung zu vermeiden. Von den Pflanzen, die als weiblicher Kreuzungspartner dienten, wurden alle Blütenorgane einer ungeöffneten Blüte, mit Ausnahme des Stempels, entfernt. Der Stempel konnte anschließend mit den Staubgefäßen

des männlichen Kreuzungspartners bestäubt werden. Die Bestäubung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Heterochromatisches Gen-Silencing des transgenen *LUCIFERASE*-Repeats

##### 3.1.1 Histonmodifizierungen und Repeat-abhängiges TGS des *LUC*-Transgens

Zur Aufklärung der epigenetischen Prozesse, die transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) an den transgenen *LUCIFERASE*-Repeats in *Arabidopsis thaliana* kontrollieren, wurden zunächst epigenetische Modifizierungen am *LUC*-Locus in den verschiedenen Luc-Linien analysiert. Neben der Methylierung von DNA ist auch die Modifizierung von Histonen ein wichtiger epigenetischer Prozess. Histon-Methyltransferasen katalysieren die Übertragung von Methylgruppen auf hochkonservierte Lysine und Arginine in der aminoterminalen Region der Histone. Zur Analyse von Histonmodifizierungen an spezifischen Zielsequenzen ist die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eine etablierte Methode.

Für das Monitoring der *LUCIFERASE*-Expression in den transgenen Linien wurden die Aufnahmen der emittierten Lumineszenzstrahlung mit einem CCD-Kamerasystem verwendet. In der Linie Luc1, die nur eine Einzelkopie der *LUC*-Kassette enthält, konnte damit die höchste Luciferaseaktivität detektiert werden. Die Linie Luc2, die wie alle anderen *LUC*-Linien eine vierfache *LUC*-Kassette enthält, zeigt partielle Lumineszenz (Abb. 3.1 A; Hofmann 2004).

Die ChIP-Untersuchungen erfolgten in der Linie Luc1, die eine transkriptionell aktive Einzelkopie des *LUC*-Repeats enthält und in den Linien Luc2, Luc7 und Luc9, die ein vierfaches *LUC*-Repeat enthalten und ein entweder partiell transkriptionell inaktives (Luc2) oder komplett transkriptionell inaktives *LUC*-Transgen (Luc7 und Luc9) besitzen (Abb. 3.1. A). In diesen vier Luc-Linien wurden mittels ChIP die Histonmodifikationen am *LUCIFERASE*-Locus quantifiziert, welche mit transkriptionell aktivem Chromatin (H3K4me2, H3K4me3, H3K9Ac, H3K36me2) (Zhang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008; Earley *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2004) oder mit transkriptionell inaktivem Chromatin (H3K9me2, H3K27me1, H3K27me2) (Soppe *et al.*, 2002; Tariq *et al.*, 2003; Bastow *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2005; Lindroth *et al.*, 2004) assoziiert sind. Für die Analysen wurde aus Blattmaterial der untersuchten Luc-Linien Kernextrakte isoliert und daraus mittels Ultraschall geschertes und fragmentiertes Chromatin gewonnen. Zur Chromatinlösung wurden anschließend spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Histonmodifizierungen dazugegeben und somit Chromatinfragmente immunpräzipitiert, die mit der untersuchten



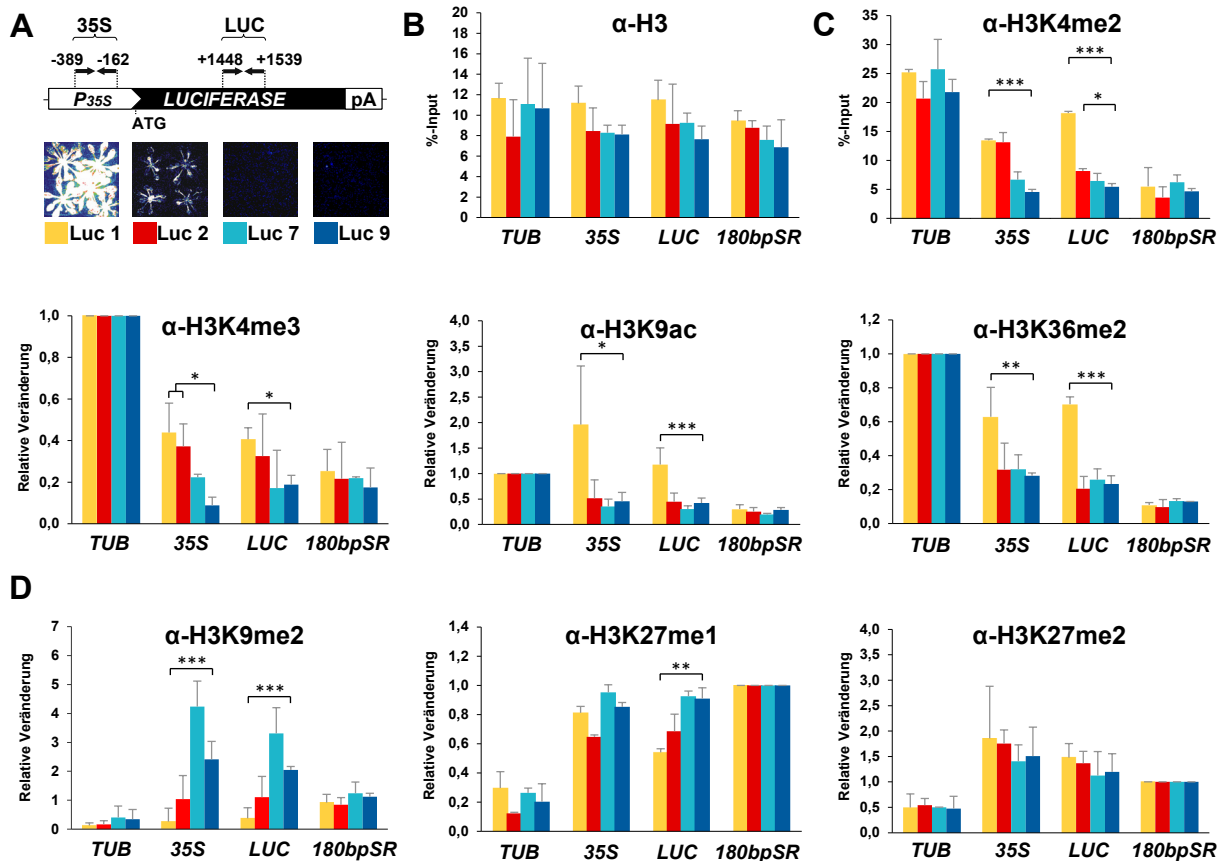
Histonmodifizierung assoziiert sind. Die verwendeten spezifischen Antikörper können dabei zwischen Mono-, Di- und Trimethylierungen der Histone unterscheiden.

Der Nachweis der mit der Zielsequenz assoziierten Histonmodifizierungen und nach Proteinverdau und Aufreinigung erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte mittels quantitativer *Real-Time-PCR*. Damit konnte quantifiziert werden, welche Menge an präzipitierten DNA-Fragmenten (%-Input) im Vergleich zur eingesetzten Gesamtmenge an Chromatinfragmenten (100 %-Input) isoliert wurde. Es wurden ChIP-Analysen für den CaMV 35S-Promotor sowie für die kodierende *LUC*-Sequenz durchgeführt, um mögliche Unterschiede von Histonmodifizierungen zwischen diesen beiden Genregionen zu verifizieren. Als Kontrollgene wurden das euchromatische  $\alpha$ -*TUBULIN* (*At1g04820*) und das mit Heterochromatin assoziierte *180bp-SINGLE REPEAT (180bpSR)* analysiert. Das *180bpSR*-Repeat ist ein spezifisches Element, das im Perizentromer von *Arabidopsis* inseriert ist und an dem die Histonmodifizierungen H3K9me2, H3K27me1 und H3K27me2 nachgewiesen werden konnten (Ay *et al.*, 2009; Mathieu *et al.*, 2005).

Zunächst wurde in jeder ChIP die Effizienz der Chromatinfragmentierung durch Ultraschall gelelektrophoretisch überprüft. Nach mehreren Ultraschallvorversuchen wurde eine Ultraschallbehandlung von zehnmal 30 sec ausgewählt, wodurch Chromatinfragmente von 200 bp bis 1000 bp, mit einer mittleren Größe von 500 bp, entstanden. Diese Fragmentgrößen ermöglichten eine vergleichende Analyse des 35S-Promotors (35S) und der untersuchten *LUC*-Region (*LUC*), die 1610 bp voneinander entfernt sind. Die verwendeten Primerpaare amplifizieren im 35S-Promotor ein 227 bp-Fragment 162 bp *upstream* vom ATG-Startcodon und im *LUCIFERASE*-Gen ein 91 bp-Fragment 1448 bp *downstream* vom ATG-Startcodon (Abb. 3.1 A).

Zur Untersuchung auf die Anwesenheit von Nukleosomen in den analysierten Genregionen wurden ChIP-Analysen mit einem Antikörper gegen das Histon H3 durchgeführt. Dieser Antikörper bindet unabhängig vom Methylierungsstatus an das Histon H3. In allen *Luc*-Linien wurde eine vergleichbare Assoziation von Nukleosomen in der untersuchten 35S-Promotorregion und der *LUC*-Region gefunden, was eine wichtige Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der ChIP-Ergebnisse von den untersuchten Histonmodifikationen ist (Abb. 3.1 B). Aufgrund der Verwendung verschiedener Antikörperchargen, bedingt durch die zeitlich und quantitativ limitierende Verfügbarkeit einzelner Antikörper über den gesamten Zeitraum des Experimentes, kam es zu Schwankungen in den maximalen %-Inputwerten zwischen den einzelnen ChIP-Analysen. Zur Verifizierung und vergleichenden Analyse wurde der %-Inputwert des Referenzgens durch den %-Inputwert des untersuchten

Genbereiches dividiert. Damit wurde die relative Veränderung ermittelt, welche die Assoziation der untersuchten Histonmodifizierung in der jeweiligen Luc-Linie im Vergleich zum Referenzgen aufzeigt. Für die euchromatischen Histonmodifizierungen wurden die %-Inputwerte des *LUC*-Transgens auf die %-Inputwerte des euchromatischen  $\alpha$ -*TUBULIN*-Gens bezogen. Für die heterochromatischen Histonmodifizierungen dienten die %-Inputwerte am heterochromatischen *180bp-SINGLE REPEAT* als Berechnungsgrundlage.



**Abb. 3.1: ChIP-Analysen von euchromatischen und heterochromatischen Histonmethylierungen am 35S::*LUCIFERASE*-Transgen in den Luc-Linien.** (A) Genomische Struktur einer *LUCIFERASE*-Expressionskassette und Lage der verwendeten Primer für die *Real-Time*-PCR zur Amplifikation des 35S-Promotors (35S) und einer kodierenden *LUC*-Region (*LUC*). Die Pfeile bezeichnen Lage und Richtung der verwendeten Primer. Aufnahmen der emittierten Lumineszenzstrahlung von Blättern der vier untersuchten Luc-Linien und das zugehörige Farbschema zur Differenzierung der Luc-Linien in den ChIP-Abbildungen (gelb=Luc1, rot=Luc2, hellblau=Luc7, dunkelblau=Luc9). Das Weiß in den Lumineszenzaufnahmen entsteht durch Luciferaseaktivität (Linien Luc1 und Luc2), schwarz bedeutet keine Luciferaseaktivität (Linien Luc7 und Luc9). (B) ChIP mit einem Antikörper gegen Histon H3 zum Nachweis auf Anwesenheit von Nucleosomen in den untersuchten Genbereichen. (C) Analyse der euchromatischen Histonmarkierungen H3K4me2, H3K4me3, H3K9Ac und H3K36me2. (D) Analyse der heterochromatischen Histonmethylierungen H3K9me2 und H3K27me1. Als euchromatisches Kontrollgen wurde  $\alpha$ -*TUBULIN* (*TUB*) und als heterochromatisches Kontrollgen das *180bp-SINGLE REPEAT* (*180bpSR*) verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an (n=3-5). Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt (p<0,05 mit \*, p<0,01 mit \*\* und p<0,005 mit \*\*\*).

Die Funktionalität und Spezifität der Antikörper in den ChIP-Analysen wird durch die Detektion der euchromatischen Histonmodifizierungen (H3K4me<sub>2</sub>, H3K4me<sub>3</sub>, H3K36me<sub>2</sub> und H3K9Ac) an dem euchromatischen und transkriptionell aktiven Kontrollgen *α-TUBULIN* im Vergleich zu dem heterochromatischen Kontrollgen *180bpSR* gezeigt (Abb. 3.1 C). Zusätzlich wurde die Spezifität der Antikörper in *Dot-Blot*-Analysen überprüft (siehe Anhang 7.2). Am *180bpSR* konnten für die heterochromatischen Histonmodifizierungen H3K9me<sub>2</sub>, H3K27me<sub>1</sub> und H3K27me<sub>2</sub> höhere Werte als für das *α-TUBULIN*-Gen detektiert werden (Abb. 3.1 D).

Für die beiden analysierten Genbereiche im *35S*-Promotor und im *LUC*-Gen wurden in der Luc1 die höchsten %-Inputwerte für die euchromatischen Histonmodifizierungen H3K4me<sub>2</sub>, H3K4me<sub>3</sub>, H3K9Ac und H3K36me<sub>2</sub> und damit die höchsten Werte im Vergleich zu den anderen untersuchten Luc-Linien Luc2, Luc7 und Luc9 gefunden (Abb. 3.1 C). Die Werte am *35S*-Promotor und am *LUC*-Gen für H3K4me<sub>2</sub> und H3K36me<sub>2</sub> liegen in der Luc1 deutlich über den Werten des *180bpSR*-Gens, erreichen aber nicht ganz das %-Input Level des *α-TUBULIN*-Gens. Nur für die H3K9-Acetylierung (H3K9ac) ist das Level in der Luc1 an beiden untersuchten Transgen-Bereichen höher als am *α-TUBULIN*-Gen. Für die Methylierung H3K4me<sub>3</sub> sind die ermittelten Unterschiede zur heterochromatischen Kontrolle und in den Luc-Linien untereinander am geringsten. Die Assoziation mit H3K4me<sub>3</sub> hat scheinbar eher eine untergeordnete Funktion in der Suppression des Gen-*Silencings* des *LUC*-Locus. Vielmehr scheint die Assoziation mit H3K4me<sub>2</sub>, H3K9Ac und H3K36me<sub>2</sub> eine wichtige Rolle bei den Aktivierungsprozessen des *LUC*-Transgens zu spielen und korrelieren mit transkriptioneller Aktivierung des *LUC*-Repeats in den Linien Luc1 und Luc2 (Abb. 3.1 A).

In den ein inaktiviertes *LUC*-Transgen enthaltenen Linien Luc7 und Luc9 konnte im Gegensatz dazu die höchste Menge an den heterochromatischen Histonmethylierungen H3K9me<sub>2</sub> und H3K27me<sub>1</sub> detektiert werden, wobei in der Luc9 doppelt so viel H3K9me<sub>2</sub> am *35S*-Promotor als in der Luc7 gefunden wurde (Abb. 3.1 D). Die Werte für H3K9me<sub>2</sub> sind in Luc7 und Luc9 am Transgen auch wesentlich höher als an dem heterochromatischen *180bpSR*-Gen. Im Vergleich dazu erreicht das Level von H3K27me<sub>1</sub> am Transgen in den Linien Luc7 und Luc9 fast das Level von H3K27me<sub>1</sub> am *180bpSR*-Gen, allerdings sind auch die Werte für Luc1 und Luc2 deutlich über dem Level von *α-TUBULIN* (Abb. 3.1 D). Die Analyse der Linie Luc2 mit einem partiell inaktiven Transgen lieferte höhere Werte für die euchromatischen Methylierungen H3K4me<sub>2</sub> und H3K4me<sub>3</sub> und niedrigere Werte für die heterochromatischen Methylierungen H3K9me<sub>2</sub> und H3K27me<sub>1</sub> am *LUC*-Repeat im

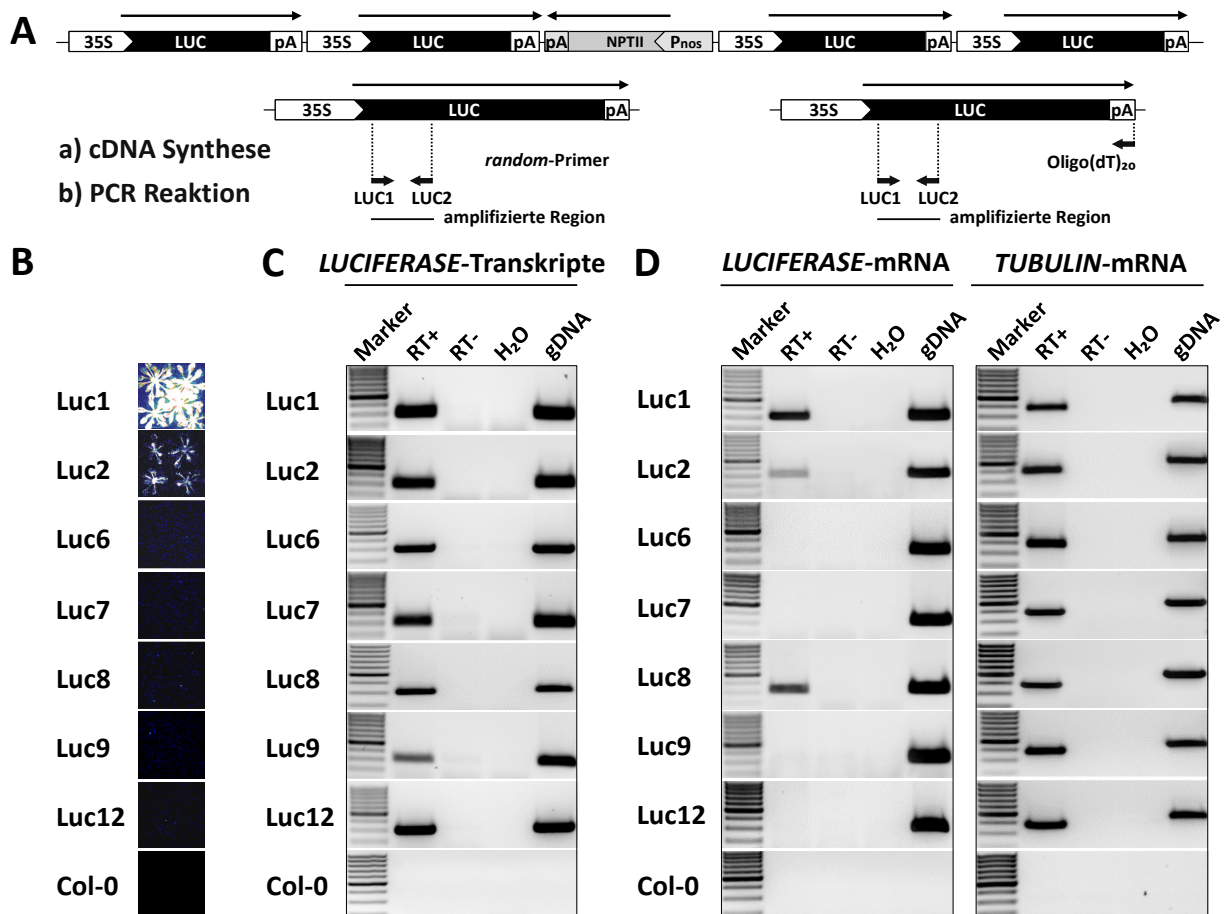
Vergleich zu den Linien Luc7 und Luc9 (Abb. 3.1 C und D). Die detektierten Werte für die Linie Luc2 sind dabei immer kleiner als die Werte in der Linie Luc1 und größer als die Werte der Linien Luc7 und Luc9. Für die Methylierung H3K27me2 wurden keine Unterschiede in den vier untersuchten Linien am 35S-Promotor und am untersuchten *LUC*-Bereich detektiert und die Menge von H3K27me2 ist in allen Linien vergleichbar mit dem Methylierungsniveau am *180bpSR*-Gen (Abb. 3.1 D). In den vergleichenden Analysen der Histonmodifizierungen H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K36me2, H3K9me2, H3K27me1 und H3K27me2 zwischen dem 35S-Promotor und der untersuchten *LUC*-Region konnten keine oder nur geringe Unterschiede innerhalb einer Luc-Linie gefunden werden und die Tendenz der assoziierten Modifikation ist an diesen beiden Transgen-Bereichen vergleichbar (Abb. 3.1). Vor allem die Dimethylierung von H3K9, aber auch die Monomethylierung von H3K27, ist an den Heterochromatisierungsprozessen des transgenen *LUC*-Repeat beteiligt, die letztendlich zur transkriptionellen Inaktivierung des *LUC*-Gens und damit zum Gen-*Silencing* führen.

### 3.1.2 TGS von *LUC*-Repeats und die differentielle Bildung von kodierenden und nichtkodierenden *sense*-Transkripten

Zur Aufklärung der molekularen Prozesse, die transkriptionelles Gen-*Silencing* (TGS) an transgenen *LUCIFERASE*-Repeats kontrollieren, wurde zunächst die Expression des *LUCIFERASE*-Gens mittels semiquantitativer RT-PCR in den *LUC*-Linien untersucht. Die cDNA-Synthese erfolgte mit *random*-Primern und anschließend die Amplifikation der cDNA mit dem Primerpaar LUC1/LUC2, die im 5'-Bereich der kodierenden *LUC*-Sequenz binden (Abb. 3.2 A). *Random*-Primer sind eine Mischung aus zufälligen Hexaoligonukleotiden, die mehrfach an die RNA-Transkripte binden und somit unterschiedlich lange und nicht strangspezifische cDNA-Transkripte synthetisieren.

Entsprechend der Ergebnisse zur emittierten Lumineszenzstrahlung waren nur *LUC*-Transkripte in der Luc1 und Luc2 zu erwarten, denn für die anderen untersuchten *LUC*-Linien Luc6, Luc7, Luc8, Luc9 und Luc12 konnte optisch keine Luciferaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.2 B und Hofmann, 2004). Unabhängig vom aktiven oder inaktiven *LUC*-Transgen konnten allerdings in allen *LUC*-Linien *LUC*-Transkripte detektiert werden (Abb. 3.2 C). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass am *LUC*-Transgen nicht nur mRNA, sondern auch nichtkodierende RNA-Transkripte synthetisiert werden. Diese Vermutung sollte in weiteren Analysen überprüft werden.

Zunächst erfolgte die cDNA-Synthese mit einem *anchored* Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer, welcher an das komplementäre Poly(A)-Signal der mRNA bindet und spezifisch kodierende mRNAs amplifiziert. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit dem *LUCIFERASE*-spezifischen Primerpaar LUC1/LUC2 (Abb. 3.2 A). Die Amplifikation von *TUBULIN* diente als Kontrolle zur erfolgreichen reversen Transkription von polyadenylierter mRNA (Abb. 3.2 D).

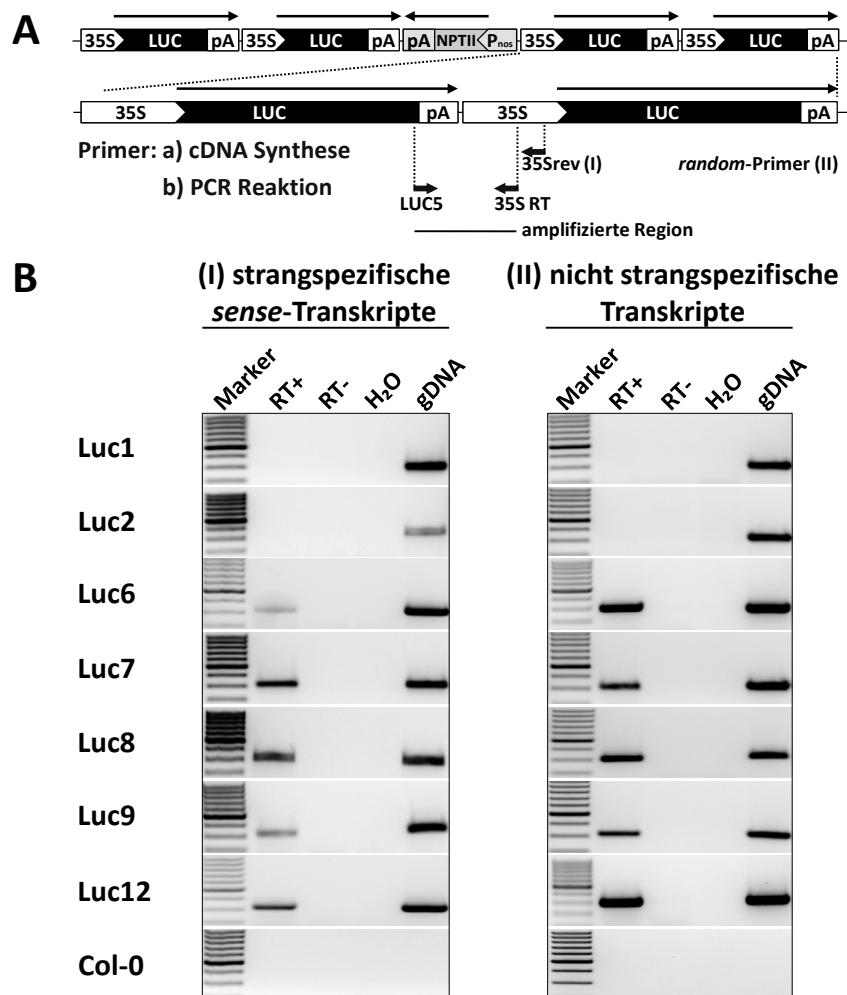


**Abb. 3.2: Analyse der *LUCIFERASE*-Expression in den Luc-Linien.** RT-PCRs zum Nachweis von *LUC*-Transkripten. **(A)** Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE* Expressionskassette und Lage der verwendeten Primer zur cDNA-Synthese (*random*-Primer bzw. *anchored* Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer) und zur Amplifikation einer kodierenden *LUC*-Region (LUC1/LUC2) am vergrößerten Ausschnitt einer *LUC*-Kassette. Lange Pfeile bezeichnen den mRNA-Transkriptionsstart und Richtung innerhalb der Expressionskassette. Kurze Pfeile bezeichnen Lage und Richtung der verwendeten Primer. **(B)** Aufnahmen der emittierten Lumineszenzstrahlung von Blättern der Luc-Linien. **(C)** Für den Nachweis von *LUC*-Transkripten wurde cDNA mit *random*-Primer synthetisiert und eine kodierende *LUC*-Region mit dem Primerpaar LUC1/LUC2 amplifiziert (RT+). **(D)** Für den Nachweis von polyadenylierten *LUC*-Transkripten (*LUCIFERASE*-mRNA) wurde cDNA mit einem *anchored* Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer synthetisiert und eine kodierende *LUC*-Region mit dem Primerpaar LUC1/LUC2 amplifiziert (RT+). *TUBULIN*-mRNA dient als Positivkontrolle zur Anwesenheit von polyadenylierter cDNA im Reaktionsansatz. Als Negativkontrollen wurden jeweils Ansätze ohne Reverse Transkriptase zum Test auf Abwesenheit von genomischer DNA in der RNA (RT-) und PCR-Wasserkontrollen (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Als PCR-Positivkontrolle diente genomische DNA (gDNA). Es wurde ein 100 bp-Marker zur Größenbestimmung verwendet. Abgebildet sind die 200 bp bis 1 kb Banden. Die Amplifikation wurde mit 32 Zyklen (C) bzw. 35 Zyklen (D) durchgeführt.

In der Linie Luc1 wurde durch Lumineszenzaufnahmen die höchste Luciferaseaktivität detektiert. In dieser Linie ist auch die höchste Expression von polyadenylierter *LUC*-mRNA mittels RT-PCR nachweisbar (Abb. 3.2 D). Die Linie Luc2 zeigt nur partielle Lumineszenz (Abb. 3.2 B und Hofmann 2004) und in RT-Analysen ist eine schwache *LUC*-Expression zu detektieren (Abb. 3.2 D). Die beiden Linien Luc1 und Luc2 sind somit transkriptionell aktiv. Die Luc-Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12 zeigen keine Lumineszenz (Abb. 3.2 B und Hofmann, 2004), und es kann keine polyadenylierte *LUC*-mRNA in RT-Analysen detektiert werden (Abb. 3.2 D). Das *LUC*-Transgen ist in diesen Linien somit transkriptionell inaktiviert. Einzige Ausnahme bildet die Linie Luc8, in der *LUC*-mRNA gebildet wird (Abb. 3.2 D), obwohl keine Lumineszenz nachweisbar ist (Hofmann, 2004). Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass in den Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12 mit *random*-Primern synthetisierte RNA-Transkripte kein Poly(A)-Signal besitzen und nichtkodierend sind.

Zusätzlich zum Nachweis von kodierender *sense*-RNA (mRNA) erfolgte deshalb auch die Analyse von nichtkodierenden *sense*-RNA-Transkripten in einem Bereich, der die 3'-Region des *LUC*-Gens und einen Teil des 35S-Promotors vor dem Transkriptionsstart überspannt. Zur strangspezifischen cDNA-Synthese wurde ein reverser Primer verwendet, welcher spezifisch *sense*-RNA-Transkripte in cDNA transkribiert. Der dazu verwendete Primer 35Srev bindet im 35S-Promotor vor dem Transkriptionsstart, womit eine cDNA-Synthese von mRNA ausgeschlossen werden sollte. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte mit dem Primerpaar LUC5/35S, welches den 3'-Bereich des *LUC*-Gens, das Poly(A)-Signal und den 35S-Promotor vor dem Transkriptionsstart überspannt und somit kodierende und nichtkodierende Bereiche amplifiziert (Abb. 3.3 A). Damit sollte zusätzlich die Amplifikation von mRNA ausgeschlossen werden. Zum Nachweis von RNA im Reaktionsansatz wurde außerdem jeweils eine Probe zur Herstellung von cDNA mit *random*-Primern synthetisiert. Damit konnte in den analysierten Linien die generelle Anwesenheit von *LUC*-Transkripten in der analysierten Region überprüft werden, da die cDNA-Synthese mit *random*-Primern nicht strangspezifisch erfolgt. In den beiden Linien Luc1 und Luc2, die ein aktives *LUC*-Transgen enthalten, konnten keine RNA-Transkripte in *sense*-Orientierung in dem 3'-Bereich des *LUC*-Gens und in dem 35S-Promotor überspannenden Bereich nachgewiesen werden (Abb. 3.3 B). Es wurde in der Luc1 auch kein Transkript in der amplifizierten Region erwartet, da diese Linie nur eine Expressionskassette enthält und die Amplifikation zwei Expressionskassetten überspannte. In allen untersuchten Luc-Linien, die ein inaktiviertes

*LUC*-Transgen enthalten, wird *sense*-RNA von der untersuchten kodierenden und nichtkodierenden 35S-Promotor überspannenden Region gebildet (Abb. 3.3 B).



**Abb. 3.3: Nachweis von *sense*-Transkripten in einer kodierenden und 35S-Promotor überlappenden nichtkodierenden Region der *LUC*-Repeats in Luc-Linien.** Strangspezifische RT-PCR zum Nachweis von *sense*-RNA. (A) Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE* Kasette und verwendete Primer zur cDNA-Synthese und Amplifikation am vergrößerten Ausschnitt von zwei *LUC*-Kassetten. Lange Pfeile definieren den mRNA-Transkriptionsstart und Syntheserichtung. Kurze Pfeile bezeichnen Lage und Orientierung der verwendeten Primer. (B) Nachweis von strangspezifischen *sense*-Transkripten in Luc-Linien (I). Mit *random*-Primern synthetisierte, nicht strangspezifische cDNA dient als Positivkontrolle zur generellen Anwesenheit von *LUC*-Transkripten in der analysierten Region (II). Als Kontrolle wurden jeweils Ansätze ohne Reverse Transkriptase (RT-) synthetisiert. Als PCR-Kontrolle diente Wasser (H<sub>2</sub>O) und genomische DNA (gDNA). Der 100 bp-Marker wurde als Größenreferenz verwendet (200 bp bis 1 kb). Die Amplifikation wurde mit 40 Zyklen (I) bzw. 32 Zyklen (II) durchgeführt.

Mit Poly(A)-Signal spezifischer RT-PCR konnte somit gezeigt werden, dass nur die Linien Luc1 und Luc2 ein transkriptionell aktives *LUC*-Transgen enthalten und *LUC*-mRNA synthetisiert wird. In den Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12 werden keine polyadenylierten *sense-LUC*-Transkripte (mRNA) detektiert (Abb. 3.2). Damit wurde nachgewiesen, dass die mit *random*-Primern synthetisierten Transkripte in den Linien mit inaktivem Transgen (Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12) kein Poly(A)-Signal besitzen und nichtkodierend sind (Abb. 3.2).

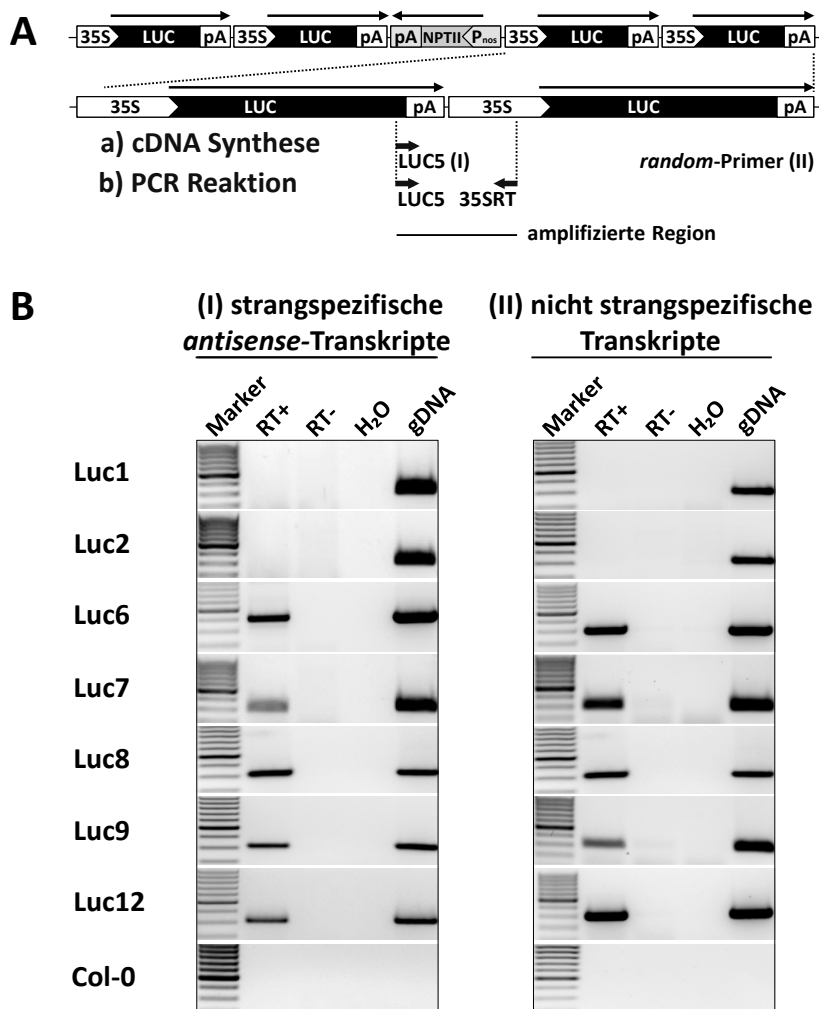
In diesen Luc-Linien ist die transkriptionelle Inaktivität somit nur in Bezug auf die Transkription von *LUC*-mRNA beschränkt. Diese nichtkodierenden Transkripte überspannen in *sense*-Orientierung sowohl kodierende *LUC*-Bereiche als auch die nichtkodierende 35S-Promotorregion. Eine Ausnahme bildet die Linie Luc8, in der sowohl *LUC*-mRNA und nichtkodierende 35S-Promotor überspannende *sense*-RNA gebildet werden. Offensichtlich wird in der Luc8, im Gegensatz zu den für die Isolation von *Silencing*-Suppressormutanten eingesetzten Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12, das *Silencing* des *LUC*-Transgens durch einen posttranskriptionellen *Silencing*-Mechanismus gesteuert.

### 3.1.3 TGS von *LUC*-Repeats und die Bildung von *antisense*-Transkripten

Es wurden außerdem strangspezifische RT-PCR Analysen in *antisense*-Orientierung durchgeführt, um zu untersuchen, ob auch *antisense*-RNAs am Gen-*Silencing* der *LUC*-Repeats eine Rolle spielen. Dazu wurden mit dem Primer LUC5 strangspezifisch *antisense*-Transkripte in cDNA transkribiert. Der verwendete LUC5 Primer bindet im 3'-Bereich der kodierenden *LUC*-Sequenz. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit dem schon zur cDNA-Synthese verwendeten LUC5-Primer und einem 35S-Promotor-Primer (Abb. 3.4 A). Damit sollten *antisense*-Transkripte nachgewiesen werden, welche sowohl einen kurzen Bereich der kodierenden *LUC*-Region als auch die nichtkodierende 35S-Promotorregion überspannen. In der gleichen Region wurden in den Linien mit inaktivem Transgen bereits nichtkodierende *sense*-Transkripte gefunden (Abb. 3.4 B).

In der nur eine *LUC*-Einzelkopie enthaltenden transkriptionell aktiven Linie Luc1 und in der Linie Luc2 mit einem partiell inaktivierten *LUC*-Transgen werden keine *antisense*-Transkripte synthetisiert (Abb. 3.4 B). Es wurde in der Luc1 auch kein Transkript in der amplifizierten Region erwartet, da die Linie nur eine Expressionskassette enthält und die Amplifikation zwei Expressionskassetten überspannte. In den Linien Luc6, Luc7, Luc8, Luc9 und Luc12, die inaktive *LUC*-Transgenrepeats enthalten, konnten in der *LUC*- und 35S-Promotor überlappenden Region nichtkodierende *antisense*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.4 B). Die Ergebnisse belegen, dass die detektierten *antisense*-Transkripte sowohl kodierende als auch nichtkodierende Bereiche des *LUC*-Repeats überspannen. Diese nichtkodierenden Transkripte scheinen beim transkriptionellem Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat eine wichtige Rolle zu spielen.





**Abb. 3.4: Nachweis von antisense-Transkripten in einer kodierenden und 35S-Promotor überlappenden Region des *LUC*-Repeats in *Luc*-Linien.** Strangspezifische RT-PCR zum Nachweis von *antisense*-RNA. **(A)** Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE* Kasette und verwendeten Primern zur cDNA-Synthese und Amplifikation am vergrößerten Ausschnitt von zwei *LUC*-Kassetten. Lange Pfeile bezeichnen den mRNA-Transkriptionsstart und Syntheserichtung. Kurze Pfeile definieren Lage und Orientierung der verwendeten Primer. **(B)** Nachweis von *antisense*-Transkripten in allen Linien mit inaktivem *LUC*-Transgen (RT+). Mit *random*-Primern synthetisierte, nicht strangspezifische cDNA dient als Kontrolle zur generellen Anwesenheit von *LUC*-Transkripten in der analysierten Region (RT+). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-) und eine PCR-Wasserkontrolle (H<sub>2</sub>O) mitgeführt. Als PCR-Positivkontrolle diente genomische DNA (gDNA). Der 100 bp-Marker (200 bp bis 1 kb) diente als Größenreferenz. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen (I) bzw. 32 Zyklen (II).

### 3.1.4 *Antisense*-Transkripte an *LUC*-Repeats sind Polymerase V-abhängig

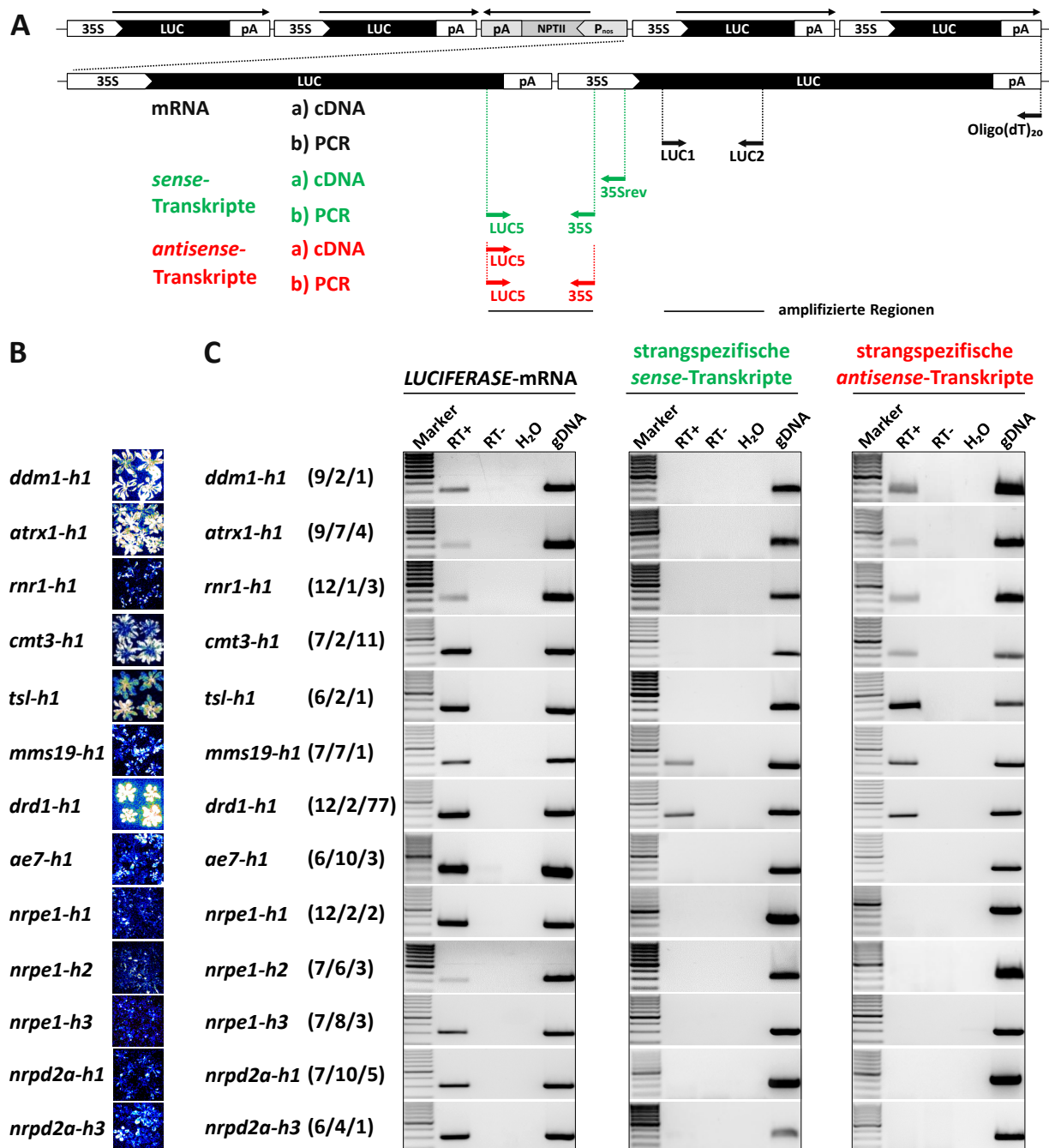
Nach den RT-Analysen in den *LUC*-Linien wurde auch eine Auswahl verschiedener *Silencing*-Suppressormutanten auf die Bildung von RNA-Transkripten am *LUC*-Repeat untersucht, um die Rolle der verschiedenen Faktoren bei der Synthese dieser Transkripte und ihr Einfluss auf das transkriptionelle Gen-*Silencing* (TGS) zu analysieren. Dafür wurden die gleichen Primerkombinationen verwendet und Transgenbereiche amplifiziert, die auch schon für die Transkriptanalysen in den *Luc*-Linien genutzt wurden (Abb. 3.5 A).

In den Suppressormutanten ist das Gen-*Silencing* am *LUC*-Transgen aufgehoben. Die reaktivierte *LUCIFERASE*-Expression wurde durch die Aufnahme von Lumineszenzstrahlung in Blättern der Mutanten detektiert (Abb. 3.4 B). Eine Voraussetzung dafür ist die Bildung von polyadenylierter mRNA. In RT-Analysen mit einem Poly(A)-spezifischen Primer (Oligo(dT)<sub>20</sub>) und anschließender Amplifikation einer kodierenden *LUC*-Region mit dem Primerpaar LUC1/LUC2 wurde in allen Suppressormutanten polyadenylierte *LUC*-mRNA nachgewiesen (Abb. 3.5 C). Das *LUC*-Repeat ist in den *Silencing*-Suppressormutanten somit wieder transkriptionell aktiv.

Zur Analyse von nichtkodierenden Transkripten wurden strangspezifische RT-Analysen an einem Bereich durchgeführt, der die 35S-Promotor-Sequenz und einen kurzen Abschnitt der kodierenden *LUC*-Sequenz überspannt. Die den 3'-*LUC*-Bereich und den 35S-Promotor überspannenden nichtkodierenden *sense*-RNAs sind in fast allen untersuchten Suppressormutanten, mit Ausnahme von *mms19-h1* und *drd1-h1*, nicht nachweisbar (Abb. 3.5 C). Wahrscheinlich wird die Transkription von nichtkodierenden *sense*-Transkripten im promotorüberlappenden Bereich durch die Bindung der Polymerase II und mRNA-Synthese blockiert. Interessanterweise konnten jedoch in den analysierten Suppressormutanten *ddm1-h1*, *atrx1-h1*, *rnr1-h1*, *cmt3-h1*, *tsl-h1*, *mms19-h1* und in der Mutante *drd1-h1* auch *antisense*-Transkripte im promotorüberspannenden Bereich mit dem Primerpaar LUC5/35S amplifiziert werden (Abb. 3.5 A). Die *antisense*-Transkripte werden somit unabhängig vom inaktiven oder aktiven Zustand des transgenen *LUC*-Repeats gebildet und die untersuchten Faktoren sind nicht an der Synthese von *antisense*-Transkripten am *LUC*-Transgen beteiligt.

In weiteren RT-PCRs wurden außerdem Mutanten für die zwei Polymerase V-Untereinheiten NRPE1 und NRPD2a analysiert. NRPE1 ist die größte Untereinheit der Polymerase V (Pol V) (Kanno *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2005). Die zweitgrößte Untereinheit NRPD2a ist nicht nur eine Komponente des Pol V-Multienzymkomplexes, sondern auch die zweitgrößte Untereinheit der Polymerase IV (Pol IV) (Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2005).

In den beiden untersuchten Mutanten für die größte Pol V-Untereinheit *nrpe1-h1* und *nrpe1-h2* konnten keine promotorüberspannenden *antisense*-Transkripte nachgewiesen werden. Es wurden ebenfalls keine *antisense*-Transkripte in dem untersuchten Bereich in den beiden Mutanten für die zweitgrößte Untereinheit der Pol V *nrpd2a-h1* und *nrpd2a-h3* gefunden. Interessanterweise wurden auch in der *AE7*-Mutante keine *antisense*-Transkripte detektiert (Abb. 3.5 C).



**Abb. 3.5: Nachweis von mRNA und nichtkodierenden *sense*- und *antisense*-Transkripten am *LUC*-Repeat in *Silencing-Suppressormutanten*.** Poly(A)- und strangspezifische RT-PCRs zum Nachweis von kodierenden und nichtkodierenden RNA-Transkripten. **(A)** Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE*-Kassette und Lage der verwendeten Primer zur cDNA-Synthese (Oligo(dT) für mRNA, 35S für *antisense*-Transkripte, 35Srev für *sense*-Transkripte) und Amplifikation (LUC1/LUC2 für mRNA, LUC5/35S für *sense*- und *antisense*-Transkripte) am vergrößerten Ausschnitt von zwei *LUC*-Kassetten. Lange Pfeile bezeichnen den mRNA-Transkriptionsstart und Richtung innerhalb der Expressionskassette. Kurze Pfeile bezeichnen Lage und Richtung der verwendeten Primer. **(B)** Aufnahmen der emittierten Lumineszenzstrahlung von Blättern der *Silencing-Suppressormutanten*. In allen Mutanten ist das *LUC*-Transgen wieder aktiv, allerdings zeigen die Mutanten starke Unterschiede in der Luciferaseaktivität. **(C)** Nachweis von polyadenylierter *LUC*-mRNA, promotorüberspannenden *antisense*-Transkripten und kodierende Bereiche und 35S-Promotor überlappenden *sense*-Transkripten (RT+). Ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-) diente als Kontrolle auf Anwesenheit von genomischer DNA in der cDNA. Als PCR-Kontrollen wurde H<sub>2</sub>O und genomische DNA (gDNA) amplifiziert. Der 100 bp-Marker (200 bp bis 1 kb) diente zur Größenbestimmung. Die Amplifikation wurde mit 35 Zyklen (polyA-cDNA) bzw. 40 Zyklen durchgeführt.

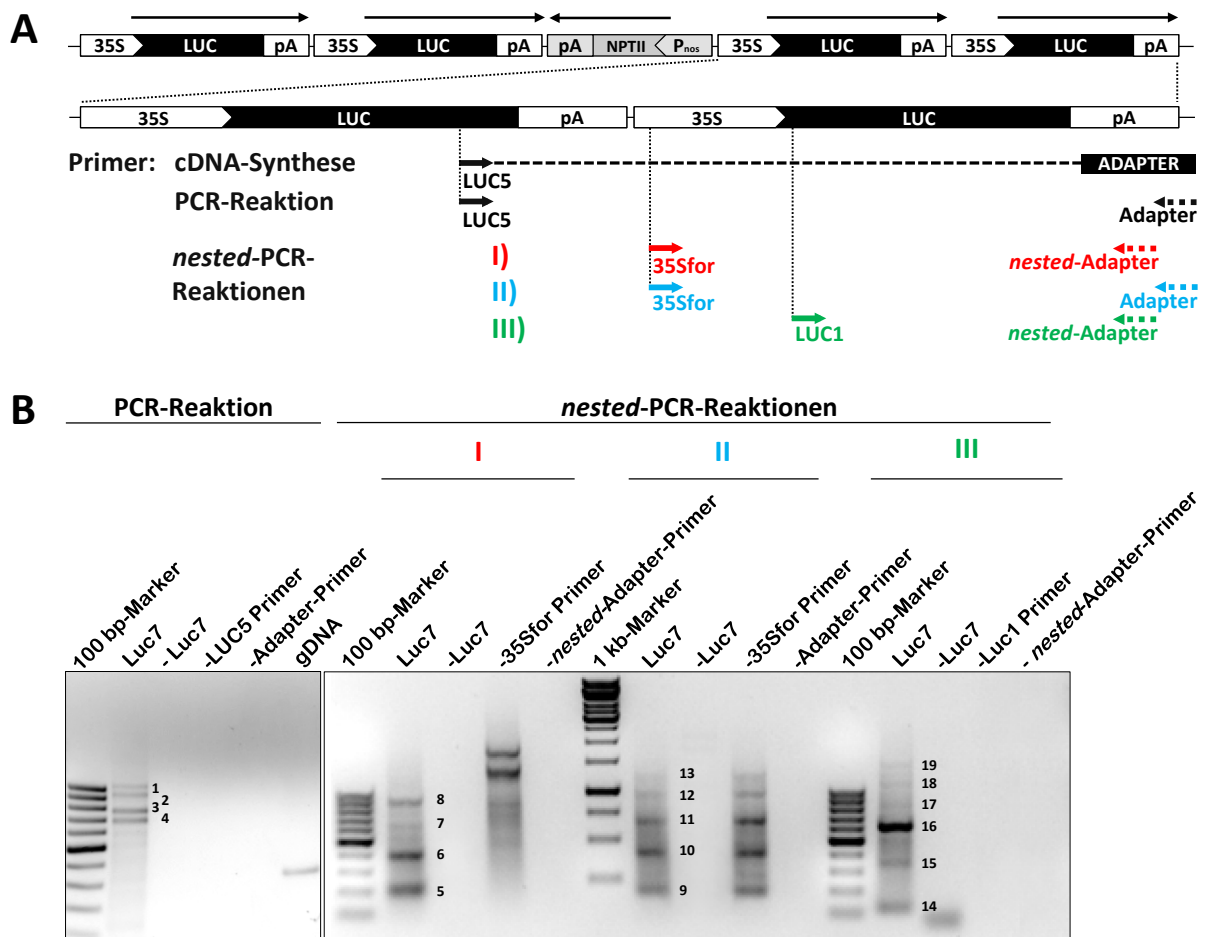
Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die *antisense*-RNAs am *LUCIFERASE*-Repeat durch die Polymerase V synthetisiert werden. Mit Ausnahme der *ASYMMETRIC LEAVES 1/2 ENHANCER 7*-Mutante (*ae7-h1*) sind im Gegensatz dazu bei allen anderen analysierten *Silencing*-Suppressormutanten diese *antisense*-Transkripte nachweisbar (Abb. 3.5 C). Vermutlich transkribiert die Polymerase V sowohl nichtkodierende *antisense*-RNAs als auch die nichtkodierenden *sense*-RNAs vom *LUC*-Repeat. Außerdem scheint das Protein AE7 (*ASYMMETRIC LEAVES 1/2 ENHANCER 7*) die Funktion der Polymerase V zu beeinflussen.

Somit werden in den analysierten Suppressormutanten, mit Ausnahme der *AE7*-Mutante, die Pol V-abhängigen nichtkodierenden RNA-Transkripte am *LUC*-Transgen synthetisiert, obwohl kein *Silencing* des Transgens etabliert wird (Abb. 3.5 B). Die epigenetischen Faktoren DDM1, ATRX1, RNR1, CMT3, TSL, DRD1 und MMS19 haben somit keinen Einfluss auf RNA-abhängige Prozesse, sondern beeinflussen wahrscheinlich nachfolgende Mechanismen der *Silencing*-Prozesse. Deshalb wurden die Suppressormutanten in weiteren Arbeiten auf Veränderungen der Histon-Methylierung untersucht (siehe Kapitel 3.1.8).

### **3.1.5 Polymerase V-abhängige RNA-Transkripte überlappen kodierende und nichtkodierende Bereiche der *LUC*-Repeats**

Zur Charakterisierung der Pol V-Transkripte wurde eine RLM-5'RACE-Analyse (*RNA ligase mediated rapid amplification of 5' cDNA ends*) an isolierter RNA der Linie *Luc7* durchgeführt. Damit sollte analysiert werden, ob die gefundenen Pol V-abhängigen RNAs an spezifischen Startpunkten des *LUC*-Repeats initiieren und welche Bereiche der Repeatstruktur von den nichtkodierenden Transkripten überspannt werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Pol V-Transkripte an ihrem 5'-Ende als Cap-Strukturen eine Triphosphatgruppe oder eine 7-Methylguanosingruppe besitzen (Wierzbicki *et al.*, 2008). Dies ermöglichte bei der RACE-Analyse die Elimination von 5'-Monophosphat tragenden RNA-Bruchstücken durch Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, CIP). An den durch Caps geschützten RNA-Transkripten ist keine Dephosphorylierung möglich. Im zweiten Schritt wurde die 5'-Cap-Struktur durch die Nikotinsäure-Pyrophosphatase (*tobacco acid pyrophosphatase*, TAPP) entfernt, wobei ein 5'-Monophosphat erhalten bleibt, welches zur Ligation eines RNA-Oligonukleotid-Adapters durch die T4-RNA-Ligase benötigt wird.

Anschließend erfolgte die reverse Transkription mit dem reversen Primer LUC5, der im 3'-Bereich der *LUCIFERASE*-Sequenz bindet und spezifisch die cDNA-Synthese von *antisense-LUC*-Transkripten ermöglicht (Abb. 3.6 A). Die Amplifikation der Erststrang-cDNA 5'-Enden erfolgte mit dem zur cDNA-Synthese verwendeten LUC5-Primer und dem im RACE-Kit enthaltenen Adapter™-Primer (Abb. 3.6 A). Dieser Adapter™-Primer ist komplementär zu dem 5'-Ende des RNA-Oligonukleotid-Adapters, welcher an die 5'-Enden der RNA-Transkripte ligiert wurde. Somit sollten nur *LUC*-Transkripte amplifiziert werden, die den ligierten Adapter besitzen und in cDNA transkribiert wurden.



**Abb. 3.6: RLM-5'RACE-Analyse der 5'-Enden von Pol V-abhängigen *LUC*-Transkripten in der Linie Luc7.** (A) Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE*-Kassette und Lage der verwendeten Primer zur cDNA-Synthese und Amplifikation am vergrößerten Ausschnitt von zwei *LUC*-Kassetten. Lange Pfeile bezeichnen den mRNA-Transkriptionsstart und Richtung innerhalb der Expressionskassette. Kurze Pfeile bezeichnen Lage und Richtung der verwendeten Primer. Zur cDNA-Synthese wurde der im 3'-Bereich der kodierenden *LUC*-Sequenz bindende reverse LUC5-Primer verwendet und cDNA mit dem selbem LUC5-Primer und dem im Kit enthaltenen Adapter™-Primer amplifiziert. Es wurden drei *nested*-PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen 35Sfor/*nested*-Adapter, 35Sfor/Adapter und LUC1/*nested*-Adapter durchgeführt. (B) Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion (linkes Bild). Es wurden vier distinkte Banden erhalten. Elektrophoretische Auftrennung der drei *nested*-PCR-Reaktionen I, II und III (rechtes Bild). Die PCR-Ansätze amplifizieren multiple distinkte Fragmente (Banden 1 bis 19). Als PCR-Kontrollen wurden jeweils für die Primerkombinationen Ansätze ohne Luc7-cDNA (-Luc7), ohne transgenspezifischen Primer (35Sfor oder LUC1) und ohne Adapter™-Primer oder *nested*-Adapter™-Primer (-Adapter bzw. -*nested* Adapter) mitgeführt. Die Adapter™-Primer und *nested*-Adapter™-Primer binden in der Adaptersequenz.

Die PCR-amplifizierten RACE-Produkte waren in der nachfolgenden Agarosegelelektrophorese als multiple distinkte Banden zu erkennen (Abb. 3.6 B). Es wurden anschließend *nested*-PCR-Reaktionen mit drei verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Damit sollte unterschieden werden, ob es sich bei den multiplen Produkten um spezifische Amplifikate oder Artefakte handelte. Zugleich konnte die Sensitivität der PCR erhöht werden. Zwei Reaktionen wurden jeweils mit einem 35S-Promotor-Primer (35Sfor) und dem in der ersten PCR verwendeten Adapter<sup>TM</sup>-Primer bzw. auch mit einem *nested*-Adapter<sup>TM</sup>-Primer angesetzt. In der dritten Reaktion wurde ein im 5'-Bereich des kodierenden *LUC*-Locus bindender Primer (LUC1) mit dem *nested*-Adapter<sup>TM</sup>-Primer kombiniert (Abb. 3.6 A). Der *nested*-Adapter<sup>TM</sup>-Primer bindet am 3'-Ende des Adapters. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden wiederholt multiple Banden erhalten (Abb. 3.6 B). Zusätzlich sind jeweils drei Kontroll-PCRs mitgeführt worden. In den Kontrollansätzen ohne einen transgenspezifischen Primer (-35Sfor oder -LUC1) deuten die erhaltenen Banden auf unspezifische Bindungen der Adapterprimer (Adapter<sup>TM</sup>-Primer bzw. *nested*-Adapter<sup>TM</sup>-Primer) hin (Abb. 3.6 B / I und II). Da in den Kontrollen ohne Luc7-cDNA (-Luc7) und ohne Adapterprimer (-Adapter bzw. -*nested* Adapter) keine Banden detektiert wurden, konnte somit eine genomische Verunreinigung und unspezifische Bindungen der transgenspezifischen Primer (35Sfor oder LUC1) ausgeschlossen werden (Abb. 3.6 B). Es wurden nur Banden eluiert, die nicht in den Kontrollreaktionen amplifiziert wurden. Für den Ansatz I mit der Primerkombination 35S-Promotor-Primer/*nested*-Adapterprimer sind vier distinkte Banden (Bande 5-8) und aus dem Ansatz III mit der Primerkombination LUC1/*nested*-Adapter-Primer sind sechs distinkte Banden (Banden 14-19) aus dem Agarosegel eluiert worden. In dem Ansatz II mit 35S-Promotor-Primer/Adapter-Primer wurden alle Transkripte (Bande 9-13) auch in der Kontrollreaktion amplifiziert (Abb. 3.6 B) und somit handelt es sich bei diesen Fragmenten nur um unspezifische Amplifikate, deren Unspezifität durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Die eluierten Fragmente wurden in einen pGEM<sup>®</sup>T-Vektor kloniert, in *E.coli* transformiert und sequenziert. Bei der Auswertung wurden die Sequenzen auf die Anwesenheit des vollständigen Oligo-RNA-Adapters am 5'-Ende überprüft.

Insgesamt wurden Transkripte mit drei verschiedenen 5'-Enden gefunden. Das PCR-Fragment 5 kodiert für einen Startpunkt innerhalb des 35S-Promotors bei 343 bp. Die Transkripte 6 und 14 haben einen Startpunkt im 5'-Bereich des kodierenden *LUC*-Locus bei 540 bp. Der dritte Startpunkt von *antisense-LUC*-Transkripten am Basenpaar 1049 im

mittleren Bereich der kodierenden *LUC*-Sequenz wurde in insgesamt sechs verschiedenen PCR-Fragmenten (8, 5, 16, 17, 18, 19) sequenziert (Abb. 3.7).

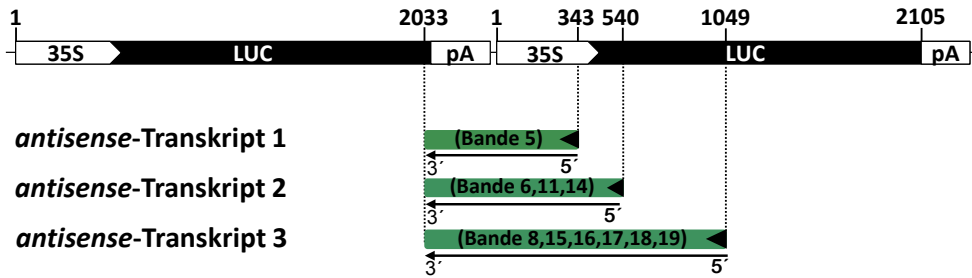


Abb. 3.7: Pol V-abhängige *antisense*-Transkripte überlappen kodierende (*LUC*) und nichtkodierende (*35S*) Genbereiche im *LUC*-Transgen. In der Sequenzierung der in der RLM-5' RACE-Analyse von *antisense-LUC* Transkripten erhaltenen PCR-Fragmente wurden drei verschiedenen 5'-Startpunkte gefunden. Die Zahlen über dem Transgenschema geben die Länge des *35S*-Promotor und *LUC* mit insgesamt 2105 bp und die gefundenen Startpunkte an den jeweiligen Basen des *LUC*-Transgens an.

		LUC5 RT Primer Sequenz →	
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	GCCTTTTGAGCTGCGTCTCTTTTAGTCTCTCTAGGAGTATTTCCGGTTCTTCCCGCCTTTCTAGCGGCACATTTTCGAACGTACGGACGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	GCCTTTTGAGCTGCGTCTCTTTTAGTCTCTCTAGGAGTATTTCCGGTTCTTCCCGCCTTTCTAGCGGCACATTTTCGAACGTACGGACGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	GCCTTTTGAGCTGCGTCTCTTTTAGTCTCTCTAGGAGTATTTCCGGTTCTTCCCGCCTTTCTAGCGGCACATTTTCGAACGTACGGACGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	CCAGTTGTACCACCTCGTGTCTGAGAGCAGATGAGGTTCTTATAGTTTCTATGTCAGAGTCTTCTGGTCTCCCGATAAECTCTGAAAAGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	CCAGTTGTACCACCTCGTGTCTGAGAGCAGATGAGGTTCTTATAGTTTCTATGTCAGAGTCTTCTGGTCTCCCGATAAECTCTGAAAAGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	CCAGTTGTACCACCTCGTGTCTGAGAGCAGATGAGGTTCTTATAGTTTCTATGTCAGAGTCTTCTGGTCTCCCGATAAECTCTGAAAAGT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	TGTTTCCCATTTATAGCCCTTTGGAGGAGCCTAAGGTAACGGGTCGATAGACAGTGAAGTAGCTTCTCTGTCATCTTTTCCTTCTACCGAA	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	TGTTTCCCATTTATAGCCCTTTGGAGGAGCCTAAGGTAACGGGTCGATAGACAGTGAAGTAGCTTCTCTGTCATCTTTTCCTTCTACCGAA	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	TGTTTCCCATTTATAGCCCTTTGGAGGAGCCTAAGGTAACGGGTCGATAGACAGTGAAGTAGCTTCTCTGTCATCTTTTCCTTCTACCGAA	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	GATGTTTACGGTAGTAACGCTATTTCCCTTTCCGATAGCAAGTTCTTACGGAGATGGCTGTACCAGGGTTTCTACCTGGGGTGGGTGCT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	GATGTTTACGGTAGTAACGCTATTTCCCTTTCCGATAGCAAGTTCTTACGGAGATGGCTGTACCAGGGTTTCTACCTGGGGTGGGTGCT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	GATGTTTACGGTAGTAACGCTATTTCCCTTTCCGATAGCAAGTTCTTACGGAGATGGCTGTACCAGGGTTTCTACCTGGGGTGGGTGCT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	CCTTGTAGCACCTTTTCTCTGCAAGGTTGGTGCAGAAGTTTCGTTACCTAACAATACTATAGAGGTGACTGCATTCCTACTGCGTG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	CCTTGTAGCACCTTTTCTCTGCAAGGTTGGTGCAGAAGTTTCGTTACCTAACAATACTATAGAGGTGACTGCATTCCTACTGCGTG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	CCTTGTAGCACCTTTTCTCTGCAAGGTTGGTGCAGAAGTTTCGTTACCTAACAATACTATAGAGGTGACTGCATTCCTACTGCGTG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	TTAGGGTGATAGGAAGCGTTCTGGGAAGGAGATATATTCCTTCAAGTAAAGTAAACCTCTCTGGAGCTCCCGGTACCTTCTGCGGTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	TTAGGGTGATAGGAAGCGTTCTGGGAAGGAGATATATTCCTTCAAGTAAAGTAAACCTCTCTGGAGCTCCCGGTACCTTCTGCGGTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	TTAGGGTGATAGGAAGCGTTCTGGGAAGGAGATATATTCCTTCAAGTAAAGTAAACCTCTCTGGAGCTCCCGGTACCTTCTGCGGTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	TTGTATTTCTTTCCGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCTCGTTGACGTATTCGGATACTTCTCTATGCGGGAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	TTGTATTTCTTTCCGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCTCGTTGACGTATTCGGATACTTCTCTATGCGGGAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	TTGTATTTCTTTCCGGCCGCGGTAAGATAGGCGACCTTCTACCTTGGCGACCTCTCGTTGACGTATTCGGATACTTCTCTATGCGGGAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	CAAGGACCTTGTTAAACGAAAATGTCTACGTGTATAGTCCACCTGTAGTGAATGCGACTCATGAAGCTTTACAGGCAAGCCAAACCGTCTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	CAAGGACCTTGTTAAACGAAAATGTCTACGTGTATAGTCCACCTGTAGTGAATGCGACTCATGAAGCTTTACAGGCAAGCCAAACCGTCTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	CAAGGACCTTGTTAAACGAAAATGTCTACGTGTATAGTCCACCTGTAGTGAATGCGACTCATGAAGCTTTACAGGCAAGCCAAACCGTCTTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	CGATACTTTGCTATACCCGACTTATGTTTAGTGTCTTAGCAGCATAAGTCACTTTTGGAGAAAGTTAAGAAATACGGCCACAACCCGCGC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	CGATACTTTGCTATACCCGACTTATGTTTAGTGTCTTAGCAGCATAAGTCACTTTTGGAGAAAGTTAAGAAATACGGCCACAACCCGCGC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	CGATACTTTGCTATACCCGACTTATGTTTAGTGTCTTAGCAGCATAAGTCACTTTTGGAGAAAGTTAAGAAATACGGCCACAACCCGCGC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	AATAAATAGCCTCAACGTCAACGGGGCGCTTGTCTGTAATATTACTTGCACCTTAACGAGTTGTCATACCCGTAAAGCGTCGGATGGCAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	AATAAATAGCCTCAACGTCAACGGGGCGCTTGTCTGTAATATTACTTGCACCTTAACGAGTTGTCATACCCGTAAAGCGTCGGATGGCAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	AATAAATAGCCTCAACGTCAACGGGGCGCTTGTCTGTAATATTACTTGCACCTTAACGAGTTGTCATACCCGTAAAGCGTCGGATGGCAC	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	CACAAGCAAAGGTTTTTCCCAACGTTTTTAAACTTGCACGTTTTTTTCGAGGGTTAGTAGGTTTTTAATAATAGTACCTAAGATTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	CACAAGCAAAGGTTTTTCCCAACGTTTTTAAACTTGCACGTTTTTTTCGAGGGTTAGTAGGTTTTTAATAATAGTACCTAAGATTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	CACAAGCAAAGGTTTTTCCCAACGTTTTTAAACTTGCACGTTTTTTTCGAGGGTTAGTAGGTTTTTAATAATAGTACCTAAGATTT	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	TGCTTAATGGTCCCTAAAGTCAGCTAGATGTGCAAGCAGTGTAGAGTAGATGGAGGGCCAAAATTAAGTATGCTAAAACACGGTCTCAGG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	TGCTTAATGGTCCCTAAAGTCAGCTAGATGTGCAAGCAGTGTAGAGTAGATGGAGGGCCAAAATTAAGTATGCTAAAACACGGTCTCAGG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	TGCTTAATGGTCCCTAAAGTCAGCTAGATGTGCAAGCAGTGTAGAGTAGATGGAGGGCCAAAATTAAGTATGCTAAAACACGGTCTCAGG	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 3	3'	AAGCTATCCCTGTTCTGTTAAACGTGACTAGTACTTGAGGAGA	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 2	3'	AAGCTATCCCTGTTCTGTTAAACGTGACTAGTACTTGAGGAGA	5'
LUC <i>antisense</i> -Transkript 1	3'	AAGCTATCCCTGTTCTGTTAAACGTGACTAGTACTTGAGGAGA	5'

Abb. 3.8: Sequenzalignment der drei identifizierten *antisense*-Transkripte am *LUC*-Repeat. Dargestellt sind die drei Sequenzen der im 5' RACE gefundenen *antisense*-Transkripte in grün rot und gelb. In der Sequenzierung der drei *antisense-LUC*-Transkripte wurden drei verschiedenen 5'-Sequenzanfänge gefunden, die zweimal mit einem Thymin (Transkript 2 und 3) und einmal mit einem Adenin (Transkript 3) beginnen (Markierung mit schwarzem Pfeil). Aufgrund der cDNA-Synthese im 5' RACE mit dem LUC5-Primer enden alle drei Sequenzen am 3'-Ende mit der LUC5-Primer-Bindesequenz.

Beim Sequenzvergleich der 5'-Anfänge der *antisense*-Transkripte wurde entweder ein Adenin oder zweimal ein Thymin gefunden (Abb. 3.8). Die am transgenen *LUC*-Repeat transkribierten Polymerase V-Transkripte besitzen somit eine 5'-Cap-Struktur, werden an multiplen Startpunkten initiiert und beginnen vermutlich mit einem Thymin oder Adenin.

### **3.1.6 Für die Startpunkte von Pol V-Transkripten konnten keine spezifischen Sequenzmotive gefunden werden**

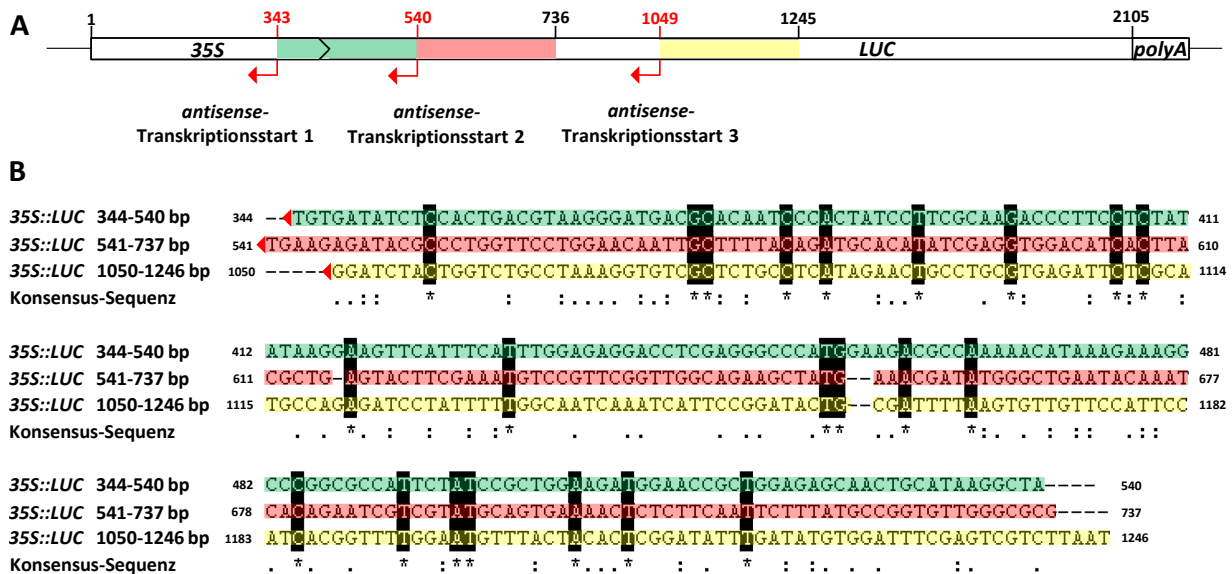
In Pro- und Eukaryoten wird die Transkription an spezifischen Sequenzmotiven initiiert. Die Initiation setzt dabei die Bindung von RNA-Polymerase-Untereinheiten an Promotoren voraus. Stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthalten die Promotoren verschiedene Konsensus-Sequenzen. Unter anderem wurden in eukaryotischen Promotoren TATA-Boxen, CAAT-Boxen sowie Initiator-Elemente (Inr-Element), *Downstream Core* Promotor-Elemente (DPEs), Transkriptionsfaktor IIB (TFIIB)-Erkennungselemente (BRE), und CpG-Inseln nachgewiesen (Butler und Kardonaga 2002).

Bisher ist nicht bekannt, ob die RNA-Polymerase V ebenfalls die RNA-Synthese an spezifischen Sequenzmotiven initiiert. In der *35S::LUCIFERASE*-Sequenz des *LUC*-Transgens konnten drei putative und Pol V abhängige *antisense*-RNA Transkriptionsstartpunkte (Basen 343, 540 und 1049) identifiziert werden (Abb. 3.7). Es ist möglich, dass die Polymerase V, ebenso wie die Polymerasen I, II und III, an spezifischen Motivsequenzen in der *LUCIFERASE*-Sequenz die Transkription initiiert. Deshalb wurden die DNA-Sequenzbereiche des *LUC*-Transgens stromaufwärts von den gefundenen *antisense*-RNA Startpunkten (Basen 343, 540 und 1049) analysiert. Die identifizierten Transkriptionsstartpunkte bei 343 bp und 540 bp liegen am nächsten zusammen und sind insgesamt 196 Basen voneinander entfernt. Falls die *antisense*-Transkription an spezifischen Elementen initiiert wird, sollten diese Elemente in einem maximalen Abstand von 196 Basen vor den jeweiligen *antisense*-Transkriptionsstartpunkten lokalisiert sein.

Aufgrund dessen wurden zur Identifizierung von putativen Konsensus-Sequenzen die drei 196 Basenpaare umfassenden *35S::LUC*-Sequenzbereiche von 344 bp-540 bp, von 541 bp-737 bp und von 1050 bp bis 1246 bp mit dem ClustalX2-Programm verglichen (Abb. 3.9). Die identifizierten Sequenzübereinstimmungen beschränken sich allerdings hauptsächlich auf eine Base und sind weit voneinander entfernt (Abb. 3.9). Es konnten somit keine Konsensus-



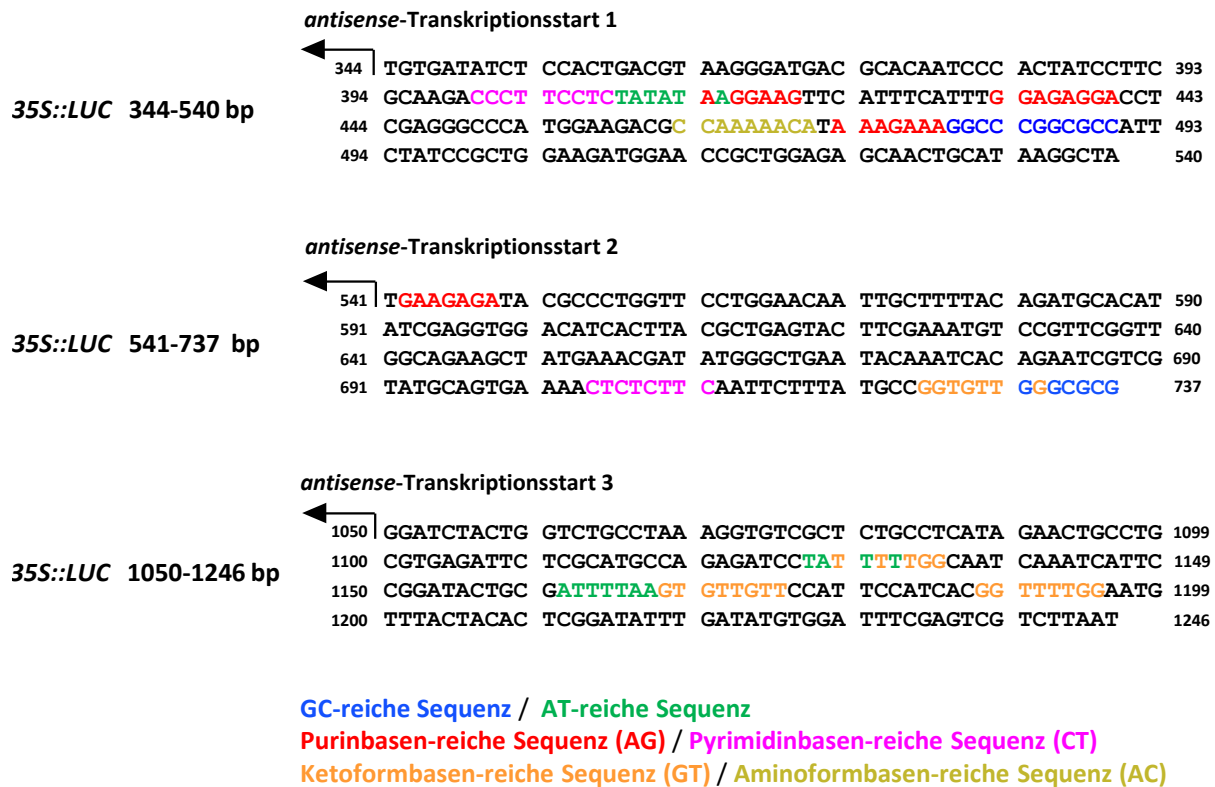
Sequenzen stromaufwärts der drei Startsequenzen der *antisense*-Transkription am *LUC*-Repeat identifiziert werden.



**Abb. 3.9: Multiples Alignment zur Identifizierung einer putativen Initiationssequenz für die *antisense*-Transkription am *LUC*-Repeat.** Es wurden je 196 Basen der genomischen *35S::LUC*-Sequenzen vor den drei *antisense*-Transkriptionsstartpunkten mit dem Programm ClustalX2 verglichen. **(A)** Schematische Darstellung der *35S::LUCIFERASE*-Sequenz. Die roten Pfeile markieren die drei identifizierten *antisense*-Transkriptionsstartpunkte und rote Zahlen geben die Base des Transkriptionsstarts an. Die untersuchten Sequenzbereiche umfassen je 196 Basen und sind grün (Basen 344-540), rot (Basen 541-736) und gelb (Basen 1050-1246) gekennzeichnet. **(B)** Die drei untersuchten genomischen Sequenzbereiche sind grün, rot und gelb der unterlegt. Die roten Pfeile geben die *antisense*-Transkriptionsstartpunkte und Richtung an. Durch Schwarz sind identische Basen in allen drei Sequenzen markiert und werden durch ein Sternchen in der Konsensus-Sequenz angegeben. Identische Basen in nur zwei der drei Sequenzen werden durch einen bzw. zwei Punkte markiert.

Zur Analyse auf das Vorhandensein von TATA-Box oder CpG-Elementen ähnlichen Sequenzen wurden zudem die drei *LUC*-Sequenzbereiche auf TA- und GC-reiche Sequenzen überprüft (Abb. 3.10). Die Inr-Elemente sind in eukaryotischen Promotoren wichtige pyrimidinreiche Sequenzen, die von TFIID und TATA-Bindeprotein assoziierten Faktoren (TAFs) erkannt und gebunden werden (Carcamo *et al.*, 1991; Chalkley und Verrijzer 1999; Butler und Kardonaga 2002).

Auch purinreiche Promotorsequenzen (Hafner *et al.*, 1995) sowie Ketoformbasen (GT)-reiche Elemente (Lai *et al.*, 1998) wurden in eukaryotischen Promotoren beschrieben. Deswegen wurden auch Basenabfolgen der beiden Purinderivate Adenin und Guanin und der Pyrimidinderivate Cytosin und Thymin sowie Abfolgen der Aminoformbasen Adenin und Cytosin und der Ketoformbasen Thymin und Guanin analysiert. Auch hier konnten keine übereinstimmenden motivähnlichen Basenabfolgen stromaufwärts der drei putativen Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10:** Analyse von spezifischen Basenabfolgen in den 35S::LUCIFERASE-Sequenzbereichen stromaufwärts der drei identifizierten *antisense*-Transkriptionsstartpunkte. Die untersuchten drei genomischen Sequenzbereiche umfassen je 196 Basen (Basen 344-540, Basen 541-736 und Basen 1050-1245). Durch schwarze Pfeile sind die drei *antisense*-Transkriptionsstartpunkte markiert. Durch Blau werden GC-reiche und durch Grün AT-reiche Basenabfolgen farblich hervorgehoben. Purinbasen-reiche Sequenzen (AG) sind rot und Pyrimidinbasen-reiche Sequenzen (CT) sind durch Magenta markiert. Ketoformbasen-reiche Sequenzen (GT) werden orange und Aminoformbasen-reiche Sequenzen (AC) gelb hervorgehoben. Überlagernde Basenabfolgen werden durch abwechselnde Basenfarben definiert. Die Analyse erfolgte mit dem Programm SCOPE.

### 3.1.7 TGS am *LUC*-Repeat ist unabhängig von der Bildung von siRNAs

Die Anwesenheit von *LUC-sense* und *LUC-antisense*-Transkripten in den untersuchten *Silencing*-Mutanten lässt die Bildung eines RNA-Doppelstranges vermuten. Zur Analyse dieses möglichen Ereignisses wurde versucht, ein Experiment zum Nachweis von Doppelstrang-RNA zu etablieren. Dazu musste zunächst die doppelsträngige RNA isoliert werden. Es wurde dafür RNA mit dem Standardprotokoll zur RNA-Extraktion mit kaltem Trizol isoliert. Zur Entfernung von DNA wurde die präparierte RNA außerdem mit DNase behandelt. Die erhaltene RNA-Lösung enthielt nun ein Gemisch aus einzelsträngiger RNA (ssRNA) und doppelsträngiger RNA (dsRNA). Zur Entfernung der einzelsträngigen RNAs wurde die RNA-Lösung mit RNase A behandelt. RNase A ist eine Endoribonuklease, die spezifisch einzelsträngige RNAs degradiert (Nichols und Yue 2008). Es wurden verschiedene RNase A Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet. An der mit RNase A und DNase verdauten RNA wurde eine cDNA-Synthese mit *random*-Primern durchgeführt.

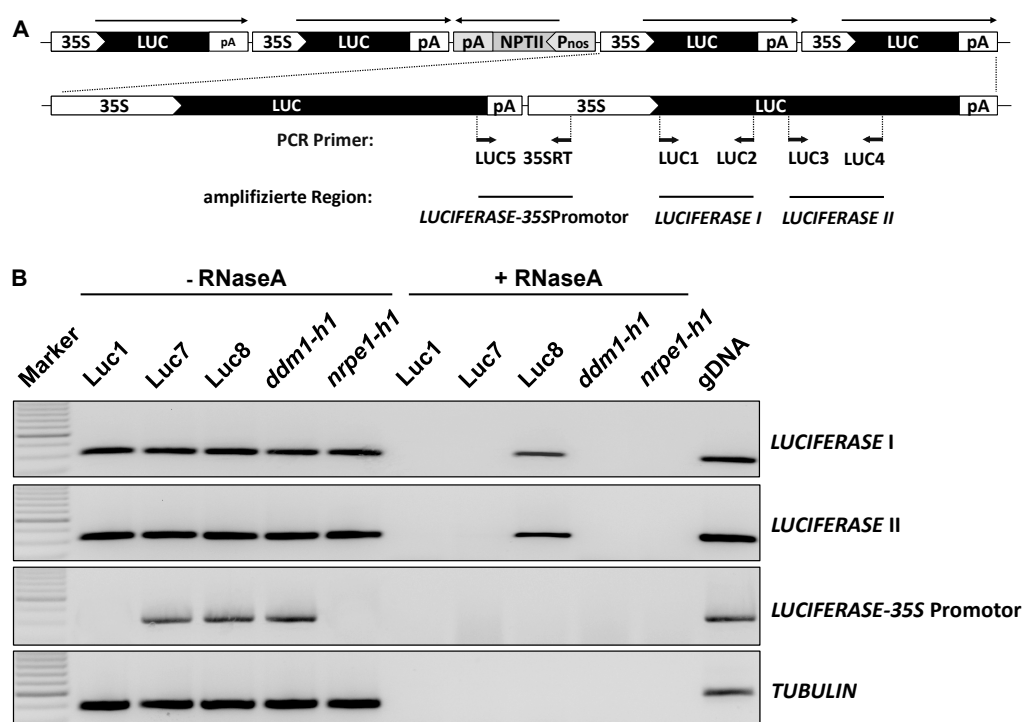
Der Nachweis von doppelsträngiger RNA erfolgte anschließend in PCR-Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen. Analysiert wurde einmal der das *LUC*-Gen und den *35S*-Promotor überspannende Bereich, indem in den transkriptionell inaktiven Luc-Linien und in den *Silencing*-Suppressormutanten *antisense*-Transkripte nachgewiesen wurden (Abb. 3.4; Abb. 3.11 B). Außerdem wurde die kodierende *LUC*-Region analysiert, an welcher *sense*-RNA (mRNA) in transkriptionell aktiven Luc-Linien und in *Silencing*-Suppressormutanten detektiert werden konnte (Abb. 3.3; Abb. 3.5; Abb. 3.11 B).

Zur Analyse wurden die Linien Luc1, die Luc 7 und die Luc 8 verwendet. In der Luc1 konnte *sense-LUC*-Transkript, aber kein *antisense-LUC*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.3; Abb. 3.4). In der transkriptionell inaktiven Linie Luc 7 wurde kein *sense*-Transkript, aber ein *antisense*-Transkript am *LUC*-Repeat nachgewiesen. Das *LUC*-Transgen in der Luc 8 wird über PTGS inaktiviert, indem siRNAs aus doppelsträngigen RNAs synthetisiert werden und in der sowohl *sense*- und *antisense-LUC*-Transkripte nachweisbar waren (Abb. 3.3; Abb. 3.4). Ebenfalls konnten *sense*- und *antisense-LUC*-Transkripte in den *Silencing*-Suppressormutanten detektiert werden. Zur Analyse wurde zunächst die Chromatin-*Remodeling*-Mutante *ddm1-h1* untersucht. Außerdem erfolgte die Untersuchung der Polymerase V-Mutante *nrpe1-h1*, in der keine Polymerase V abhängige *antisense*-Transkripte am *LUC*-Transgen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.5).

Zur Kontrolle wurden die RT-PCR-Analysen zusätzlich an RNase A-unbehandelter RNA (-RNase) durchgeführt. Da in der Luc1 nur ein *LUC*-Gen integriert ist, kann in der PCR mit den *LUC*-Gen und *35S*-Promotor überspannenden Primern (*LUC5/35SRT*) kein PCR-Produkt in den mit RNase A unbehandelten Proben amplifiziert werden (Abb. 3.11 B). Ebenfalls wurde kein PCR-Produkt in dieser promotorüberspannenden Region (*LUCIFERASE-35SPromotor*) in der *nrpe1-h1* detektiert (Abb. 3.11 B), da in dieser Mutante keine Pol V-abhängigen *antisense*-Transkripte synthetisiert werden und in diesem nichtkodierenden Bereich keine mRNA transkribiert wird (Abb. 3.5 C). Aufgrund der Verwendung von *random*-Primern für die cDNA-Synthese kann in den anderen untersuchten RNase A-unbehandelten Proben an den untersuchten *LUCIFERASE*-Regionen I und II nicht zwischen *sense*- und *antisense*-Transkript des Amplifikationsproduktes unterschieden werden (Abb. 3.11 B). Die Amplifikation von *TUBULIN* erfolgte zur Kontrolle auf vollständigen Verdau von einzelsträngiger RNA durch die RNase A. Es konnte kein PCR-Produkt mit *TUBULIN*-Primern in den mit RNase A behandelten Proben amplifiziert werden und der Verdau von einzelsträngiger RNA war somit vollständig (Abb. 3.11 B).

Es wurde kein PCR-Produkt in den *Silencing*-Suppressormutanten *ddm1-h1* und *nrpe1-h1*, sowie in der *Luc1* und *Luc7* nach RT-PCR an mit RNase A behandelter RNA an den drei untersuchten Regionen synthetisiert. Somit scheinen in diesen Linien die *sense*-RNA und *antisense*-RNA keinen Doppelstrang zu formieren und wurden als einzelsträngige RNAs durch die RNase A degradiert. Es konnte nur in der durch PTGS inaktivierte Linie *Luc8* ein PCR-Produkt in den zwei untersuchten Regionen des kodierenden *LUCIFERASE*-Gens (*LUCIFERASE I* und *II*) nachgewiesen werden (Abb. 3.11 B).

Die *LUC-sense*-RNA (mRNA) und *LUC-antisense*-RNA scheinen somit in der *Luc8* einen Doppelstrang zu bilden, der die beiden untersuchten *LUCIFERASE*-Regionen I und II überspannt. Da ein RNA-Doppelstrang die Voraussetzung zur Bildung von siRNAs ist, wird somit wahrscheinlich transkriptionelles Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat unabhängig von der Bildung von siRNAs aufrechterhalten.



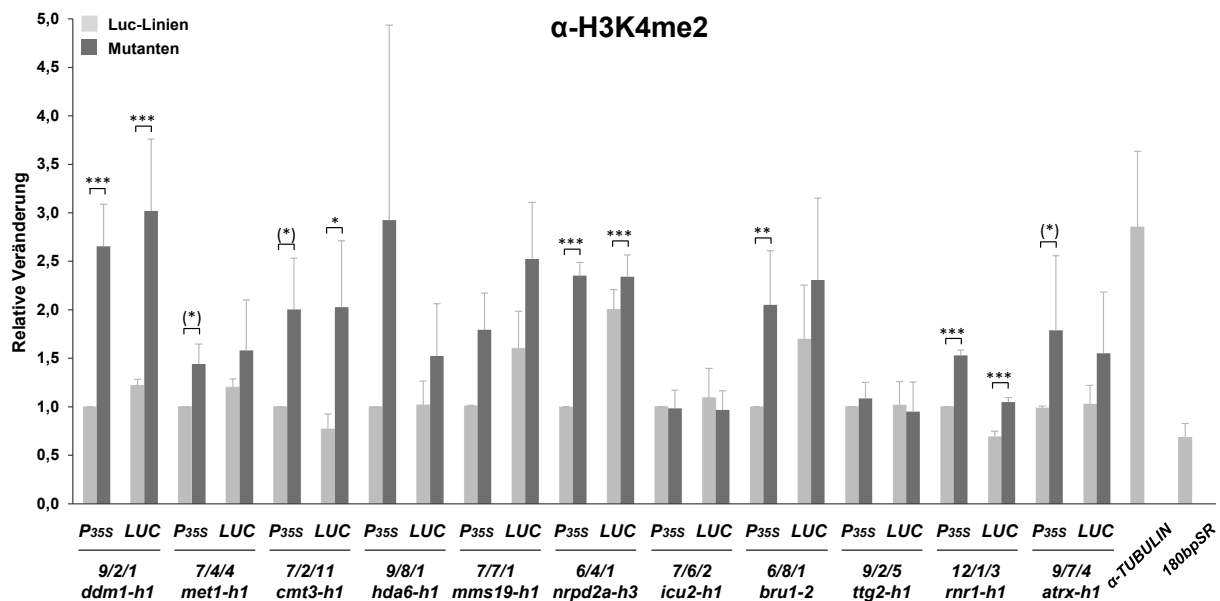
**Abb. 3.11: Nachweis von doppelsträngiger RNA (dsRNA) am *LUC*-Transgen in der Linie *Luc8*.** Zum Nachweis von doppelsträngiger RNA wurde eine RT-PCR Analyse mit *random*-Primern an mit RNase A und DNase behandelte RNA durchgeführt. (A) Genomische Struktur der T-DNA mit vierfacher *LUCIFERASE* Kasette und Lage der verwendeten Primer zur Amplifikation der cDNA am vergrößerten Ausschnitt von zwei *LUC*-Kassetten. Lange Pfeile bezeichnen Transkriptionsstart und Richtung innerhalb der Expressionskasette. Kurze Pfeile bezeichnen Lage und Richtung der verwendeten Primer. Zur cDNA-Synthese wurden *random*-Primer verwendet. Die Amplifikation erfolgte an den drei Regionen *LUCIFERASE-35SPromotor*, *LUCIFERASE I* und *II*. (B) RT-PCR an mit RNase A unbehandelte RNA diente zur Kontrolle (- RNase). Zur Entfernung von einzelsträngiger RNA erfolgte eine RNase A-Verdau (+ RNaseA). Das Kontrollgen *TUBULIN* wird nicht amplifiziert und bestätigt eine vollständige Degradierung von einzelsträngigen RNAs. Nach RNase A-Verdau konnte nur in der Linie *Luc8* ein PCR-Produkt in den zwei untersuchten Regionen des kodierenden *LUC*-Gens (*LUCIFERASE I* und *II*) nachgewiesen werden. Als PCR-Kontrolle wurde genomische DNA (gDNA) amplifiziert und zur Größenkontrolle wurde ein 100 bp-Marker verwendet. Abgebildet sind die 200 bp bis 1 kb Banden.

### 3.1.8 Einfluss von TGS-Suppressormutanten auf Histonmodifizierungen an *LUC*-Repeats

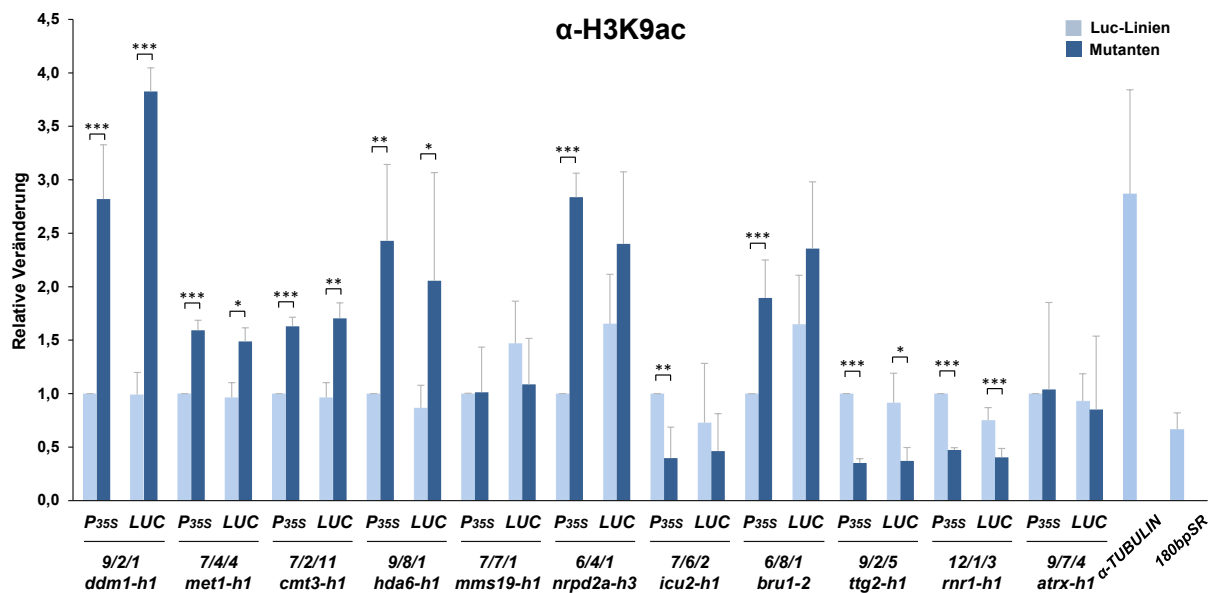
Nach den Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen (ChIP) in den Luc-Linien wurden auch in verschiedenen *Silencing*-Suppressormutanten euchromatische und heterochromatische Histonmethylierungen am *LUC*-Repeat untersucht, um die Rolle der verschiedenen Faktoren bei der Etablierung von Histonmodifizierungen und ihr Einfluss auf das transkriptionelle Gen-*Silencing* (TGS) zu analysieren. Es wurde hierfür die ein transkriptionell inaktives *LUC*-Repeat enthaltene Luc-Linie als Kontrolle und die jeweils in dieser Linie durch EMS-Mutagenese selektierte *Silencing*-Suppressormutante mittels ChIP untersucht. Somit diente für die ChIP-Analysen in den Suppressormutanten 6/4/1 und 6/8/1 die Linie Luc6, für die Mutanten 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1 und 7/6/2 die Linie Luc7, für die Mutanten 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5 und 9/7/4 die Linie Luc9 und für die Mutante 12/1/3 die Linie Luc12 als jeweilige Kontroll-Linie. Zur Immunopräzipitation wurden spezifische Antikörper gegen die euchromatischen Histonmodifizierungen H3K4me2 und H3K9ac sowie gegen die heterochromatischen Histonmethylierungen H3K9me2, H3K27me1 und H3K27me2 verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Wie schon in der vergleichenden Analyse der assoziierten Histonmodifizierungen in den Luc-Linien am 35S-Promotor und an der *LUC*-Sequenz (siehe Kapitel 3.1.1) erfolgte der Nachweis der mit den Zielsequenzen assoziierten Histonmodifizierungen und nach Proteinverdau und Aufreinigung erhaltenen DNA-Fragmente mittels quantitativer *Real-Time*-PCR. Als Kontrollgene wurde in jeder ChIP das euchromatische  $\alpha$ -*TUBULIN*-Gen (*At1g04820*) und das mit Heterochromatin assoziierte perizentromere 180bp-*SINGLE-REPEAT* (180bpSR) analysiert (Ay *et al.*, 2009; Mathieu *et al.*, 2005).

Zur Verifizierung und vergleichenden Analyse der verschiedenen ChIP-Wiederholungen, bedingt durch verschiedene Antikörperchargen, wurde der %-Inputwert aus der *Real-Time*-PCR am 35S-Promotor in der jeweiligen Luc-Linie auf einen Wert von 1 gesetzt ( $\% \text{-Input}_{35S; \text{Luc-Linie}} / \% \text{-Input}_{35S; \text{Luc-Linie}} = 1$ ). Die %-Inputwerte für das *LUC*-Gen in der Luc-Linie und für den 35S-Promotor und das *LUC*-Gen in der *Silencing*-Suppressormutante wurden mit dem %-Inputwert am 35S-Promotor der Luc-Linie dividiert und damit ein Quotient ermittelt, welcher die relative Veränderung der Assoziation der untersuchten Histonmodifizierung in der *Silencing*-Suppressormutante im Vergleich zur jeweiligen Luc-Linie aufzeigt ( $\% \text{-Input}_{LUC, \text{Luc-Linie}} / \% \text{-Input}_{35S, \text{Luc-Linie}}$  bzw.  $\% \text{-Input}_{35S \text{ oder } LUC, \text{Mutante}} / \% \text{-Input}_{35S, \text{Luc-Linie}}$ ).

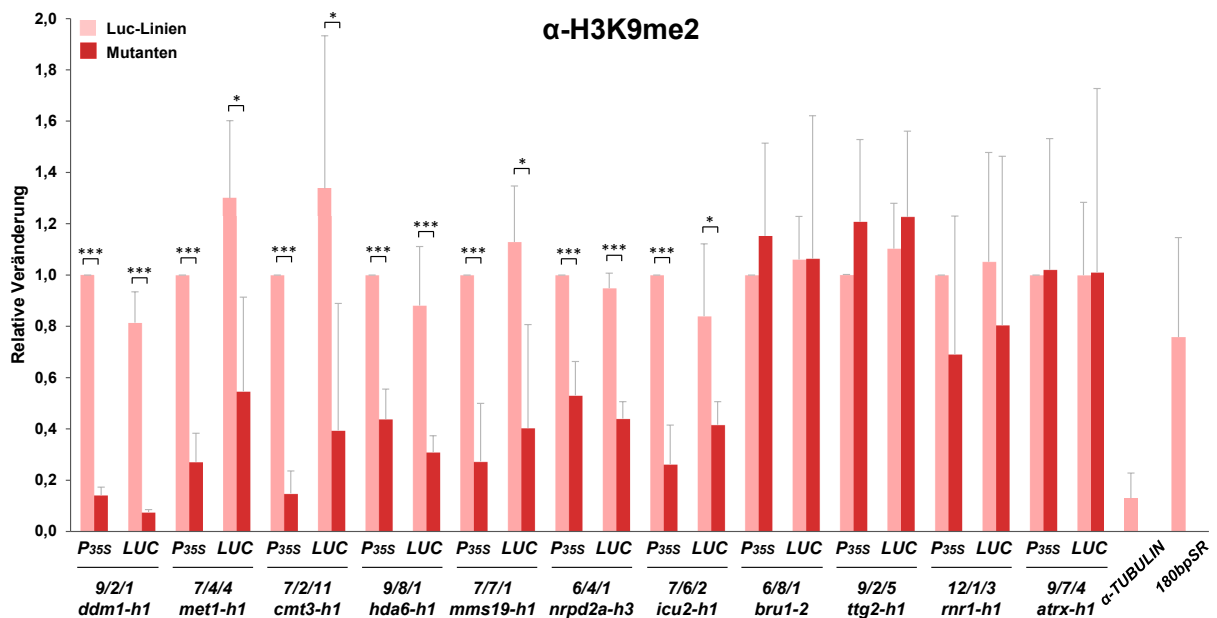
In den untersuchten Luc-Linien sind die in der ChIP detektierten euchromatischen Modifizierungen H3K4me2 und H3K9ac am *35S*-Promotor und am untersuchten *LUC*-Locus gleichhoch wie an dem heterochromatischen *180bp-SINGLE REPEAT* (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Die Reaktivierung des *LUC*-Gens in den *Silencing*-Suppressormutanten korreliert hingegen mit einer mehr als zweifach erhöhten Assoziation mit den untersuchten euchromatischen Histonmodifizierungen H3K4me2 und H3K9ac am *35S*-Promotor und am *LUC*-Locus in den Mutanten *ddm1-h1*, *hda6-h1*, *nprd2a-h3* und *bru1-2* im Vergleich zur jeweiligen analysierten Luc-Linie. In diesen vier Suppressormutanten ist die Menge an assoziiertem H3K4me2 und H3K9Ac an der untersuchten *35S*- und *LUC*-Sequenz vergleichbar hoch mit den gefundenen Mengen an dem euchromatischen und transkriptionell aktiven Gen  $\alpha$ -*TUBULIN* (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). In den Mutanten *met1-h1* und *cmt3-h1* wurde ebenfalls eine 1,5 fache Erhöhung der beiden euchromatischen Histonmodifizierungen H3K4me2 und H3K9Ac in den ChIP-Analysen nachgewiesen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Nur eine erhöhte Assoziation von H3K4me2 wurde hingegen in den Mutanten *mms19-h1* und *atr1-1*, jedoch keine Veränderung von H3K9ac, detektiert. In der Mutante *rnr1-h1* ist die Methylierung von H3K4me2 zwar leicht erhöht, die H3K9-Acetylierung allerdings sogar um die Hälfte reduziert. Keine erhöhten Assoziationen mit H3K4me2 und H3K9ac konnte im Vergleich dazu in den Suppressormutanten *icu2-h1* und *ttg2-h1* detektiert werden, in denen H3K9ac sogar ebenfalls um die Hälfte reduziert ist (Abb. 3.12 und Abb. 3.13).



**Abb. 3.12: ChIP-Analyse der euchromatischen Methylierung H3K4me2 in *Silencing*-Suppressormutanten.** In 11 *Silencing*-Suppressormutanten (dunkelgrau) wurde die relative Veränderung von H3K4me2 im Vergleich zu ihrer jeweiligen Luc-Linie (hellgrau) am *35S*-Promotor (*P<sub>35S</sub>*) und in der *LUC*-Region (*LUC*) untersucht. Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Als euchromatisches Kontrollgen wurde  $\alpha$ -*TUBULIN* und als heterochromatisches Kontrollgen das *180bp-SINGLE REPEAT* (*180bpSR*) verwendet. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft, wobei Werte mit  $p < 0,05$  mit \*,  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,005$  mit \*\*\* markiert wurden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an ( $n \geq 3$ ).



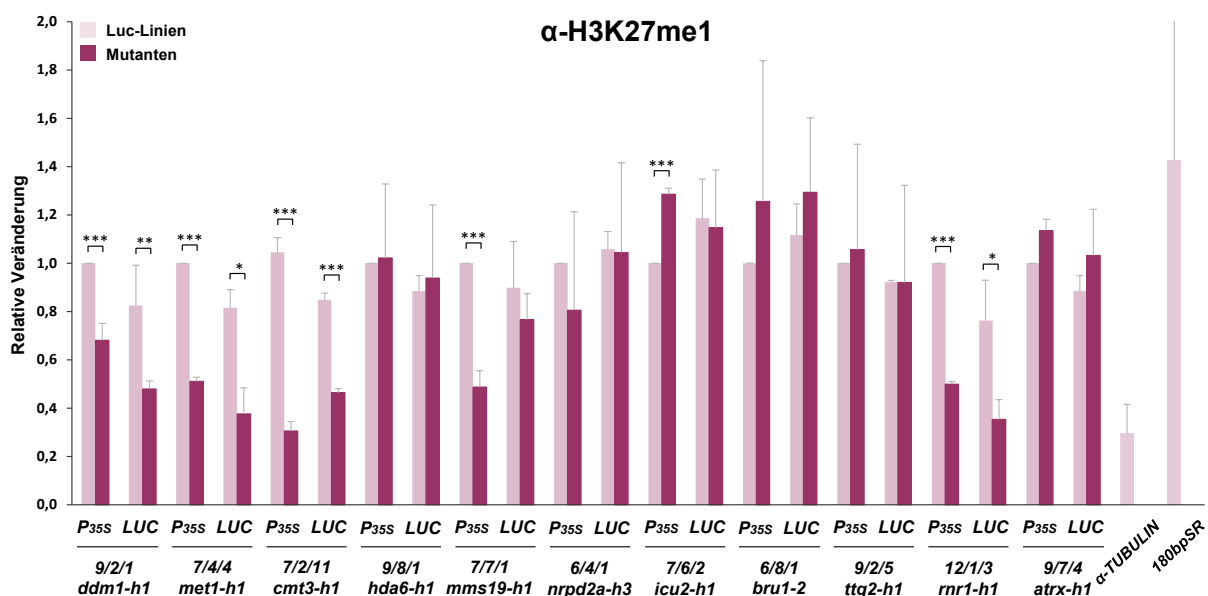
**Abb. 3.13: ChIP-Analyse der euchromatischen H3K9-Acetylierung in *Silencing-Suppressormutanten*.** Die relative Veränderung von H3K9ac wurde im Vergleich der Suppressormutante (dunkelblau) mit der jeweiligen Luc-Linie (hellblau) am 35S-Promotor (*P35S*) und in der *LUC*-Region (*LUC*) untersucht. Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Die Gene  $\alpha$ -*TUBULIN* und *180bp-SINGLE REPEAT (180bpSR)* dienen als eu- und heterochromatische Kontrollgene. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft ( $p < 0,05$  mit \*,  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,005$  mit \*\*\*). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an ( $n \geq 3$ ).



**Abb. 3.14: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K9me2 in *Silencing-Suppressormutanten*.** Die *Silencing-Suppressormutanten* (dunkelrot) wurden auf relative Veränderung von H3K9me2 im Vergleich zur jeweiligen Luc-Linie (hellrot) am 35S-Promotor (*P35S*) und in der *LUC*-Region (*LUC*) untersucht. Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Als euchromatisches Kontrollgen wurde  $\alpha$ -*TUBULIN* und als heterochromatisches Kontrollgen das *180bp-SINGLE REPEAT (180bpSR)* verwendet. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Standardabweichungen werden durch die Fehlerbalken angezeigt ( $n \geq 3$ ).

Bei der Analyse der Assoziation des *LUCIFERASE*-Transgens mit der heterochromatischen Histonmethylierung H3K9me2 konnte in den Suppressormutanten *ddm1-h1*, *met1-h1*, *cmt3-h1*, *hda6-h1*, *mms19-h1*, *nrpd2a-h1* und *icu2-h1* eine Reduktion von H3K9me2 um mehr als die Hälfte, im Vergleich zur jeweiligen analysierten Luc-Linie, nachgewiesen werden. Bis auf die Mutante *mms19-h1* korreliert in allen Mutanten die Abnahme von H3K9me2 mit einer Zunahme der euchromatischen Modifizierungen H3K9ac und H3K4me2. Trotz einer Reaktivierung der Luciferaseaktivität in den Mutanten *bru1-2*, *ttg2-h1*, *rnr1-h1* und *atrx-h1* konnte keine Veränderung der heterochromatischen Histonmethylierung H3K9me2 am *LUC*-Repeat in diesen Mutanten nachgewiesen werden. Die Menge an H3K9me2 am *LUC*-Transgen bleibt in diesen Mutanten vergleichbar hoch wie die detektierten Mengen von H3K9me2 in den Luc-Linien und an dem heterochromatischen *180bp-SINGLE REPEAT* (Abb. 3.14).

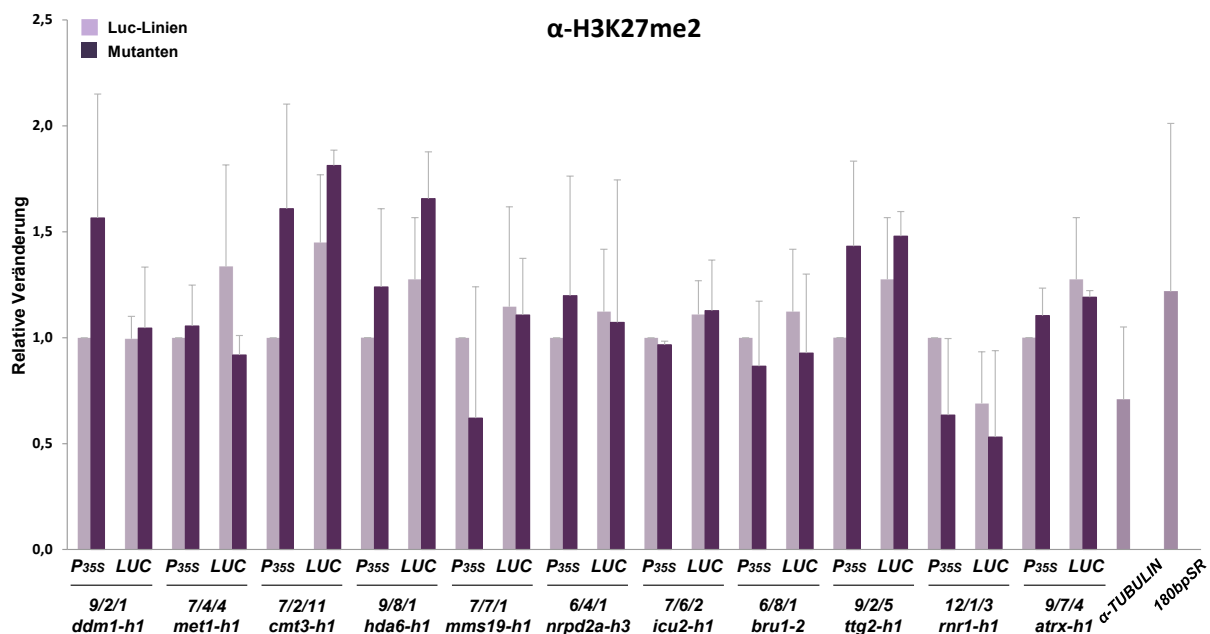
Die heterochromatische Methylierung H3K27me1 ist in den Mutanten *ddm1-h1*, *met1-h1*, *cmt3-h1* und *rnr1-h1* an den beiden untersuchten Transgen-Bereichen, und in der Mutante *mms19-h1* nur am *35S*-Promotor, um die Hälfte reduziert. In den anderen untersuchten Suppressormutanten *hda6-h1*, *nrpd2a-h1*, *icu2-h1*, *bru1-2*, *ttg2-h1* und *atrx-h1* konnten keine Veränderungen in der Assoziation mit H3K27me1 detektiert werden. Diese Mutanten zeigen eine genauso hohe Assoziation mit H3K27me1 wie die Luc-Linien am Transgen und an dem heterochromatischen *180bp-SINGLE REPEAT* (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K27me1 in *Silencing*-Suppressormutanten.** Relative Veränderung von H3K27me1 im Vergleich der *Silencing*-Suppressormutante (dunkelviolett) mit der jeweiligen Luc-Linie (hellviolett) am *35S*-Promotor (*P35S*) und in der *LUC*-Region (*LUC*). Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Die Gene  $\alpha$ -TUBULIN und *180bp-SINGLE REPEAT* (*180bpSR*) dienen als eu- und heterochromatische Kontrollgene. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an ( $n \geq 3$ ).

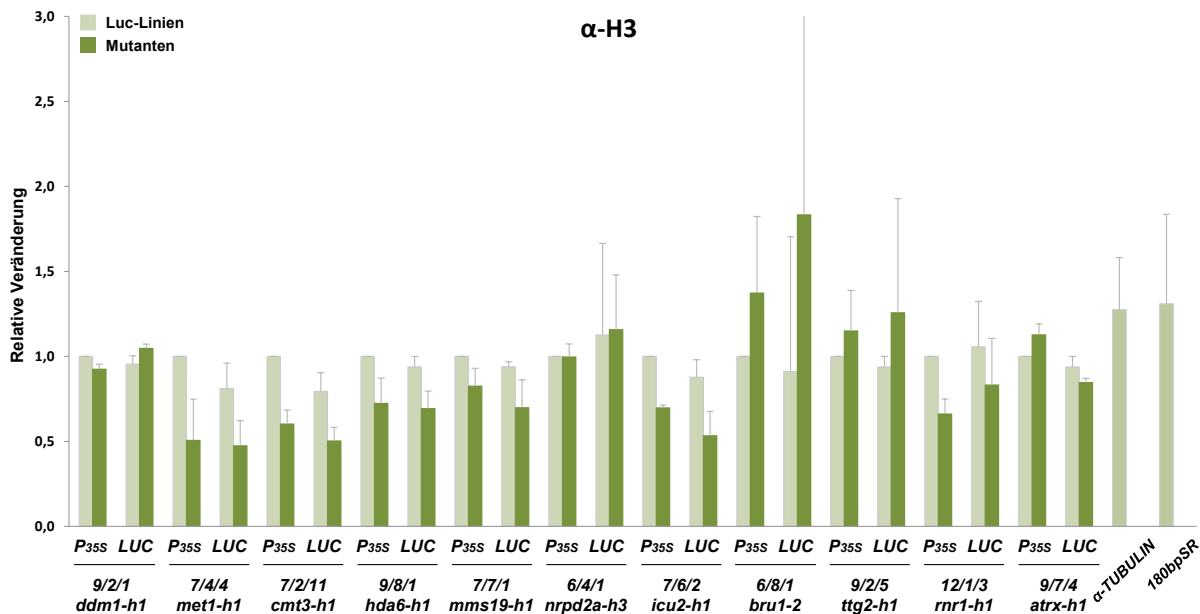


Bei der Analyse der Assoziation mit der heterochromatischen Methylierung H3K27me2 konnten keine signifikanten Veränderungen am 35S-Promotor und in der untersuchten *LUC*-Region detektiert werden. Das Methylierungslevel bleibt in den *Silencing*-Suppressormutanten im Vergleich zur den Luc-Linien erhalten und ist vergleichbar mit dem Methylierungslevel am heterochromatischen *180bp-SINGLE REPEAT* (Abb. 3.16). Die H3K27me2-Methylierung scheint somit keinen Einfluss auf das heterochromatische Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat zu haben.



**Abb. 3.16: ChIP-Analyse der heterochromatischen Methylierung H3K27me2 in *Silencing*-Suppressormutanten.** Dargestellt ist die relative Veränderung von H3K27me2 in *Silencing*-Suppressormutanten (dunkelviolet) im Vergleich zur jeweiligen Luc-Linie (hellviolett) am 35S-Promotor (*P<sub>35S</sub>*) und in der *LUC*-Region (*LUC*). Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Es wurden in allen Mutanten keine signifikanten Veränderungen des Levels von H3K27me2 detektiert. Als euchromatisches Kontrollgen wurde  $\alpha$ -TUBULIN und als heterochromatisches Kontrollgen das *180bp-SINGLE REPEAT* (*180bpSR*) verwendet. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft ( $p > 0,05$ ). Standartabweichungen werden durch die Fehlerbalken angezeigt ( $n \geq 3$ ).

Zusätzlich wurde die Assoziation von Nukleosomen an den in den ChIP-Analysen untersuchten Gensequenzen des 35S-Promotors und des *LUC*-Locus überprüft. Dafür wurde zur Präzipitation von Chromatinfragmenten ein Antikörper verwendet, der unabhängig vom Methylierungsstatus an das Histon 3 bindet. In allen *Silencing*-Suppressormutanten konnte eine Assoziation von Nukleosomen an den analysierten Genbereichen detektiert werden und ist vergleichbar mit der Nukleosomenassoziation in den jeweiligen Luc-Linien. Eine schwach reduzierte Nukleosomenassoziation wurde in den Mutanten *met1-h1*, *cmt3-h1*, *hda6-h1*, *mms19-h1*, *icu2-h1* und *rnr1-h1* am *LUC*-Transgen gefunden (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: ChIP-Analyse zum Nachweis von assoziierten Nukleosomen am 35S-Promotor und am LUC-Gen in Silencing-Suppressormutanten.** In den Suppressormutanten (dunkelgrün) wurde die relative Assoziation von H3 im Vergleich zur jeweiligen Luc-Linie (hellgrün) analysiert. Verwendete Luc-Linien: 6/4/1, 6/8/1 = Luc6; 7/4/4, 7/2/11, 7/7/1, 7/6/2 = Luc7; 9/2/1, 9/8/1, 9/2/5, 9/7/4 = Luc9; 12/1/3 = Luc12. Die Gene *α-TUBULIN* und *180bp-SINGLE REPEAT (180bpSR)* dienen als eu- und heterochromatische Kontrollgene. Zum Test auf signifikante Veränderungen wurde ein t-Test durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Nukleosomenassoziation in den Mutanten im Vergleich zur jeweiligen Luc-Linie detektiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an ( $n \geq 3$ ).

Die Ergebnisse der ChIP-Analysen belegen, dass die Anwesenheit von heterochromatischen Histonmethylierungen wie H3K9me2 und H3K27me1 und auch H3K27me2 somit nicht allein zum heterochromatischen Gen-Silencing am LUC-Repeat führt. Es müssen wahrscheinlich noch weitere epigenetische Prozesse, wie z.B. die Synthese von *noncoding*-RNAs oder DNA-Methylierung, stattfinden, um heterochromatisches Gen-Silencing zu etablieren.

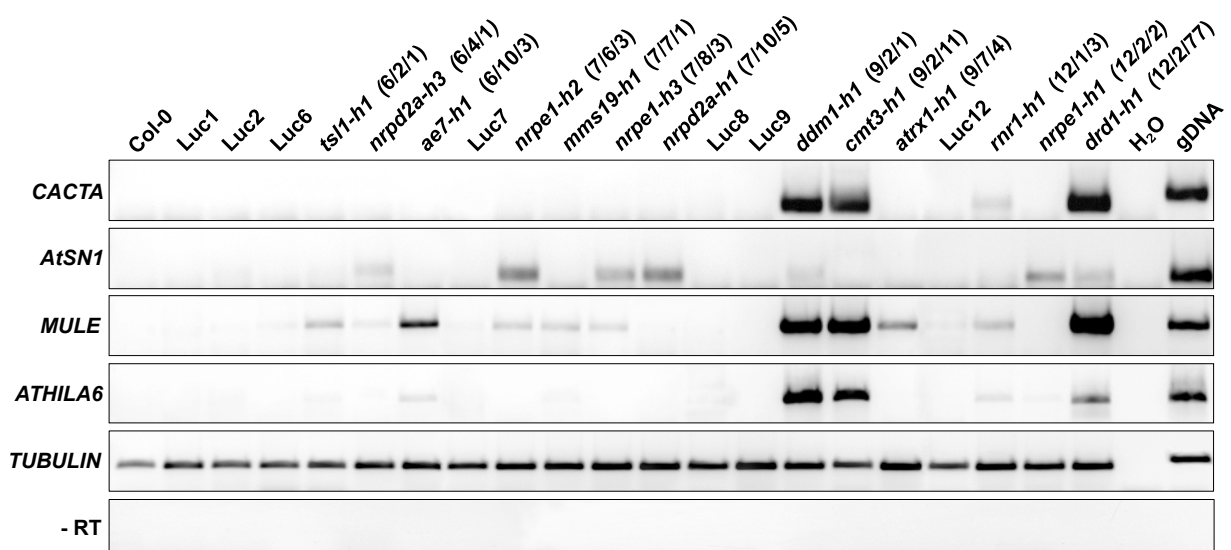
### 3.1.9 Epigenetische Effekte an mobilen Elementen fordern grundlegende heterochromatische Prozesse

Die Analysen im Rahmen dieser Arbeit dienen zur Aufklärung der epigenetischen Prozesse, die transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) an den transgenen LUCIFERASE-Repeats in *Arabidopsis* kontrollieren. In Eukaryoten spielt TGS eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Inaktivierung von repetitiver DNA. Durch das Gen-Silencing werden unter anderem repetitive transposable Elemente und Retroviren an der Ausbreitung im Genom gehindert (Matzke *et al.*, 2000; Lippman *et al.*, 2003; Matzke *et al.*, 1999). Somit ist TGS an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität beteiligt. In verschiedenen TGS-Mutanten wurde

bereits eine Mobilisierung von Transposons gezeigt, wenn die DNA-Methylierung reduziert oder auch die Assoziation von Histonmodifizierungen verändert ist (Singer *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2001; Mathieu *et al.*, 2005).

In der Kollektion der TGS-Mutanten, die in dieser Arbeit analysiert wurden, befinden sich auch bisher unbekannte Chromatinfaktoren, die wenig oder kaum Einfluss auf Histon-Methylierungen (siehe Kapitel 3.1.8) oder auch DNA-Methylierungen haben (A. Fischer, I.Hofmann, pers. Mitteilungen). Es wurde deshalb in verschiedenen TGS-Mutanten die Reaktivierung von transponiblen Elementen analysiert. Damit sollte überprüft werden, ob der Einfluss der Chromatinfaktoren auf epigenetische Prozesse nur spezifisch für das *LUC*-Repeat ist oder ob genomweite grundlegende heterochromatische Prozesse durch diese Faktoren kontrolliert werden.

Es wurde dazu die Expression von vier verschiedenen perizentromeren Transposons mittels semiquantitativer RT-PCR in verschiedenen TGS-Mutanten untersucht. Die cDNA-Synthese erfolgte mit *random*-Primern und anschließend die Amplifikation mit transposonspezifischen Primerpaaren (Abb. 3.18). Zum Nachweis von erfolgreich amplifizierter cDNA und zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Menge in der nachfolgenden PCR wurde das konstitutiv exprimierte *TUBULIN*-Gen amplifiziert. Es wurde ebenfalls für jede Mutante ein cDNA-Ansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT) synthetisiert, um genomische Kontaminationen auszuschließen (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Reaktivierung von transponiblen Elementen in *Silencing*-Suppressormutanten.** Die RT-PCR Analysen wurden an mit *random*-Primern synthetisierter cDNA durchgeführt. Es wurden vier transponible Elemente untersucht. Zum Nachweis von cDNA und zur Mengennormalisierung wurde eine PCR mit *TUBULIN*-Primern durchgeführt. Zur Kontrolle auf Abwesenheit von genomischer DNA wurden RT-PCRs an Proben ohne reverser Transkriptase (-RT) durchgeführt. Als PCR-Kontrollen wurde  $H_2O$  und genomische DNA (gDNA) verwendet.

Die Mutanten *ddm1-h1*, *cmt3-h1* und *drd1-h1* zeigen eine sehr starke Reaktivierung in der Expression des DNA-Transposons *CACTA* sowie die Reaktivierung der Retrotransposons *ATHILA6* und *MULE* (Abb. 3.18). Die *RIBONUKLEOTIDREDUKTASE 1*-Mutante (*rnr1-h1*) reaktiviert schwach ebenfalls diese vier untersuchten Transposons. Die Methylierung von DNA durch die CHROMOMETHYLASE 3 und Chromatin-Remodeling durch DDM1 und DRD1 scheint somit eine essentielle Rolle beim *Silencing* von transponiblen Elementen zu spielen. Neben diesen Faktoren ist auch noch AE7 am *Silencing* von *ATHILA6* beteiligt, was durch eine schwache Reaktivierung von *ATHILA6* in der *AE7*-Mutante aufgezeigt wird (Abb. 3.18).

Außer in den beiden Mutanten *nrpd2a-h1* und *nrpe1-h1* konnte in allen anderen untersuchten *Silencing*-Suppressormutanten eine Reaktivierung von *MULE* gezeigt werden (Abb. 3.18). Besonders stark exprimiert ist *MULE* sowohl in den Mutanten *ddm1-h1*, *cmt3-h1* und *drd1-h1* als auch in der *AE7*-Mutante (Abb. 3.18). Neben den bereits erwähnten Faktoren DDM1, CMT3, DRD1 und AE7 sind auch RNR1, die Serin/Threonin-Proteinkinase TSL, MMS19, der putative Chromatin-Remodeling-Faktor ATRX1 und die Polymerase V an *Silencing*-Prozessen von *MULE* beteiligt.

Im Vergleich dazu wurde eine starke Reaktivierung des transponiblen Retroelementes *AtSNI* (*A. thaliana SINE LIKE ELEMENT 1*) nur in den untersuchten Polymerase IV (NRPD)- und Polymerase V (NRPE)-Mutanten aufgezeigt. Eine schwache Reaktivierung von *AtSNI* konnte zudem nur in den Mutanten für die Chromatin-Remodeling-Faktoren DDM1 und DRD1 gefunden werden. Chromatin-Remodeling und die Synthese von nichtkodierenden Transkripten durch die Polymerasen IV und V scheint somit essentiell für das *Silencing* von *AtSNI* zu sein (Abb. 3.18).

Die untersuchten *Silencing*-Suppressormutanten zeigen somit nicht nur eine Reaktivierung des *LUCIFERASE*-Gens, sondern auch die Reaktivierung von transponiblen Elementen auf. Die im *LUC-Silencing*-System isolierten Chromatinfaktoren sind somit nicht nur spezifisch an *Silencing*-Prozessen des *LUC*-Repeat, sondern auch an grundlegenden heterochromatischen *Silencing*-Prozessen beteiligt.

### 3.2 Markierung von Histonvarianten zur Analyse bekannter und neuer Histonmodifizierungen

Zur Identifikation neuer Histonmodifikationen, die am heterochromatischen Gen-*Silencing* des *LUC*-Transgens beteiligt sind, ist die Etablierung eines *in vivo* Testsystems für die massenspektrometrische Analyse von Histonmodifizierungen nötig. Desweiteren sollen mit Hilfe der Massenspektrometrie die mit ChIP bereits identifizierten Veränderungen von Histonmodifizierungen in *Silencing*-Suppressormutanten überprüft werden (siehe Kapitel 3.1.8). In Vorversuchen wurden bereits Gesamthistonextrakte aus *Arabidopsis* mittels saurer Fällung präpariert und massenspektrometrisch analysiert (A. Fischer, pers. Mitteilung). Dabei stellte sich heraus, dass die massenspektrometrische Analyse von Gesamthistonextrakten aus *Arabidopsis* sehr schwierig ist und ohne eine spezifische Isolation und Aufreinigung die Analyse der Histonmodifizierungen unmöglich macht. Hinzu kommt, dass die Histonfamilien verschiedene Histonvarianten umfassen, die sich nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden (siehe Anhang Abb. 7.3; Malik und Henikoff 2003; Shi *et al.*, 2011). Diese Histonvarianten sind außerdem nicht nur unterschiedlich im Chromatin lokalisiert (Henikoff und Ahmad 2005), sondern werden auch unterschiedlich modifiziert (Stroud und Otero *et al.*, 2012). Deswegen ist eine differenzierte Analyse und Unterscheidung der Histonvarianten nötig. Der Fusions-Tag V5/His soll eine spezifische Isolation und Aufreinigung der Histonvarianten aus einem Histongesamtextrakt ermöglichen. Damit ist es möglich, auch die finalen Prozesse des *Silencing*-Mechanismus am *LUC*-Repeat aufzuklären.

#### 3.2.1 Klonierung von Histonvarianten mit V5/His

Das Genom von *Arabidopsis* umfasst insgesamt 15 *HISTONE THREE RELATED (HTR)*-Gene, die für verschiedene H3-Histone kodieren (www.chromdb.org). Die Histonvariante H3.1 wird dabei von fünf Genen (*HTR1*, *HTR2*, *HTR3*, *HTR9* und *HTR13*) kodiert (www.chromdb.org, siehe Anhang Abb. 7.3). In Vorarbeiten wurde bereits die durch das Gen *Atlg65360* kodierte H3.1-Histonvariante (*HTR1*) aus *Arabidopsis* unter der Kontrolle des *35S*-Promotors (*P35S*) mit einem V5/His-Tag kloniert und erfolgreich in *Arabidopsis* exprimiert. Es konnte in immunozytologischen Analysen eine Assoziation dieses H3.1-V5/His-Fusionsproteins mit dem Heterochromatin in den Chromozentren gezeigt werden (Gläser 2010). Mit der Analyse des unter der Kontrolle des endogenen Promotors (*PH3.1*) liegenden H3.1-V5/His-Histonfusionsproteins sollte überprüft werden, ob die

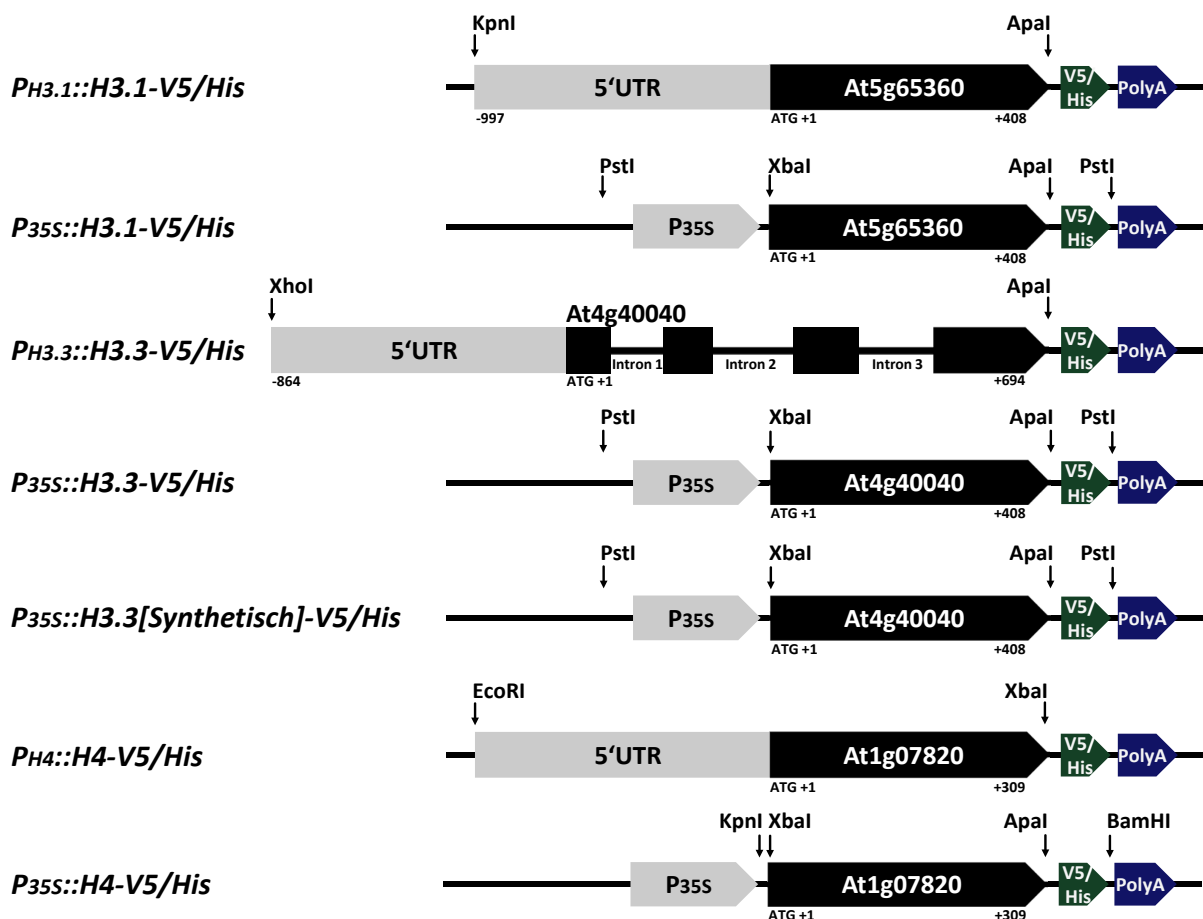
Assoziation des 35S-Fusionsproteins H3.1-V5/His mit den Chromozentren transgenspezifisch ist. Neben einem mit dem Heterochromatin assoziierten Fusionsprotein für H3 sollte zusätzlich auch ein mit dem Euchromatin assoziiertes H3-Fusionsprotein für die weiterführenden Analysen zur Verfügung stehen. Dazu sollte die Histonvariante H3.3 ebenfalls mit einem 35S-Promotor und mit dem endogenen Promotor (*PH3.3*) kloniert werden. Es sollten außerdem Histon 4-Konstrukte mit dem endogenen Promototor (*PH4*) und 35S-Promotor hergestellt werden, um eventuell neue Histonmodifizierungen am Histon 4 (H4) zu finden und den Einfluss der *Silencing*-Suppressormutanten auf die Modifizierungen am H4 mittels Massenspektrometrie analysieren zu können.

In *Arabidopsis* kodieren drei Genkopien (*HTR4*, *HTR5* und *HTR8*) für die Histonvariante H3.3 (www.chromdb.org; siehe Anhang Abb. 7.3). Die klonierte Histonvariante H3.3 (*HTR5*), die durch das Gen *At4g40040* kodiert wird, ist auf Chromosom 4 lokalisiert.

Für das Histon 4 liegen acht Genkopien, sogenannte *HFO*-Gene, im Genom von *Arabidopsis* vor, die alle nur für ein H4-Protein kodieren (www.chromdb.org; siehe Anhang Abb. 7.3; Tenea *et al.*, 2009). Zur Klonierung wurde das Gen *At1g07820* (*HFO4*) amplifiziert. Für die Herstellung der Histonfusionskonstrukte unter Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors wurden die Histonsequenzen ohne Stopcodon und inklusive eines 999 bp (H3.1), 864 bp (H3.3) bzw. 494 bp (H4) langen DNA-Sequenzabschnittes vor dem ATG-Startcodon aus genomischer DNA mit den jeweiligen spezifischen Primerpaaren amplifiziert. Im Falle des H3.3-Konstruktes enthält die klonierte genomische Sequenz zusätzlich drei Intronsequenzen (Abb. 3.19). Die Amplifikation der Histonsequenzen zur Erzeugung der Überexpressionskonstrukte unter Kontrolle des 35S-Promotors erfolgte vom ATG-Startcodon bis zum letzten Nukleotid vor dem TAA-Stopcodon. Durch die Arbeitsgruppe Houben (IPK, Gatersleben) wurde zudem eine *H3.3*-Sequenz (*H3.3*[*Synthetisch*]) für die Klonierung zur Verfügung gestellt, bei der ein Codon-Austausch erfolgte, ohne die Aminosäuresequenz des synthetisierten H3.3-Proteins zu verändern. Diese synthetische Sequenz soll ich zukünftigen Arbeiten einen *knockout* der endogenen *H3.3*-Sequenzen ermöglichen.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Elution wurden die endogenen Promotor-Histon-Fragmente und die 35S-Histon-Fragmente über die mittels Primer eingefügten endständigen Restriktionsschnittstellen gerichtet in den Zielvektor pAc5.1-V5/His ligiert. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung der Histonkonstrukte befindet sich im Anhang (siehe Anhang 7.4). Der V5/His-Tag bildet in allen Fusionsproteinen den C-Terminus (Abb. 3.19). Die Amplifikation der klonierten Histonkonstrukte erfolgte anschließend durch die Transformation in DH5 $\alpha$ -Zellen. Es wurden

positive Kolonien über PCR-Analysen selektiert und mittels Sequenzierung die Richtigkeit und Vollständigkeit der klonierten Sequenzen überprüft. Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten erfolgte die Fusion der Histon-V5/His-Fragmente mit dem konstitutiven 35S-Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) (Abb. 3.19). Dazu wurden die Histon-V5/His Sequenzen mit Restriktionsenzymen aus dem pAc5.1-V5/His Vektor ausgeschnitten und in den eine 35S-Promotorsequenz enthaltenen Zielvektor pRT100 bzw. pRT101 ligiert (siehe Anhang 7.4, Abb. 7.6). Nach der Transformation des ligierten Vektors pRT100 bzw. pRT101 in DH5 $\alpha$ -Zellen konnten über PCR-Analysen positive Kolonien selektiert werden, die durch Sequenzierung nochmals auf Vollständigkeit und Richtigkeit der ligierten Sequenzen überprüft wurden. Zur Transformation in *Arabidopsis* mussten die Histonfusionskonstrukte in die T-DNA des Binärvektors pCB302 kloniert werden.



**Abb. 3.19: Schematische Darstellung der klonierten und verwendeten Histon-V5/His-Konstrukte.** Die Klonierung des V5/His-Tags erfolgte durch Ligation der Histongene entweder ohne Promotor oder mit endogenem Promotor in den Vektor pAc5.1-V5/His. Histonkonstrukte unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors wurden zusätzlich noch über Restriktion in den Vektor pRT100 bzw. pRT101 ligiert. Pfeile zeigen die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und Zahlen die Längen der klonierten Sequenzbereiche in Basenpaaren an. Zur Transformation in *Arabidopsis* wurden die Histonkonstrukte anschließend in die T-DNA des Binärvektors pCB302 kloniert.

Dazu wurden die Histon-V5/His-Fragmente mit dem endogenen Promotor aus dem pAc5.1-V5/His-Vektor und die 35S-Histon-V5/His-Fragmente aus dem pRT100/pRT101-Vektor über Restriktionsenzyme ausgeschnitten und in den pCB302-Vektor ligiert (siehe Anhang 7.4, Abb. 7.6). Die Orientierung der Expressionskassette in der T-DNA wurde so gewählt, dass der 35S-Promotor der Histonkassette in gleicher Orientierung zum NOS-Promotor des BASTA<sup>®</sup>-Resistenzgens *BAR* liegt. Anschließend wurden positive T-DNA-Konstrukte in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Die erfolgreiche Transformation wurde durch Rücktransformation des aus *Agrobacterium tumefaciens* präparierten pCB302-Vektors in DH5 $\alpha$ -Zellen und anschließender Sequenzierung überprüft. Positive *Agrobacterium*-Kulturen wurden zur Transformation von *Arabidopsis* verwendet. Es wurden für jedes Konstrukt fünf Wildtyppflanzen (Col-0) infiltriert und bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen kultiviert.

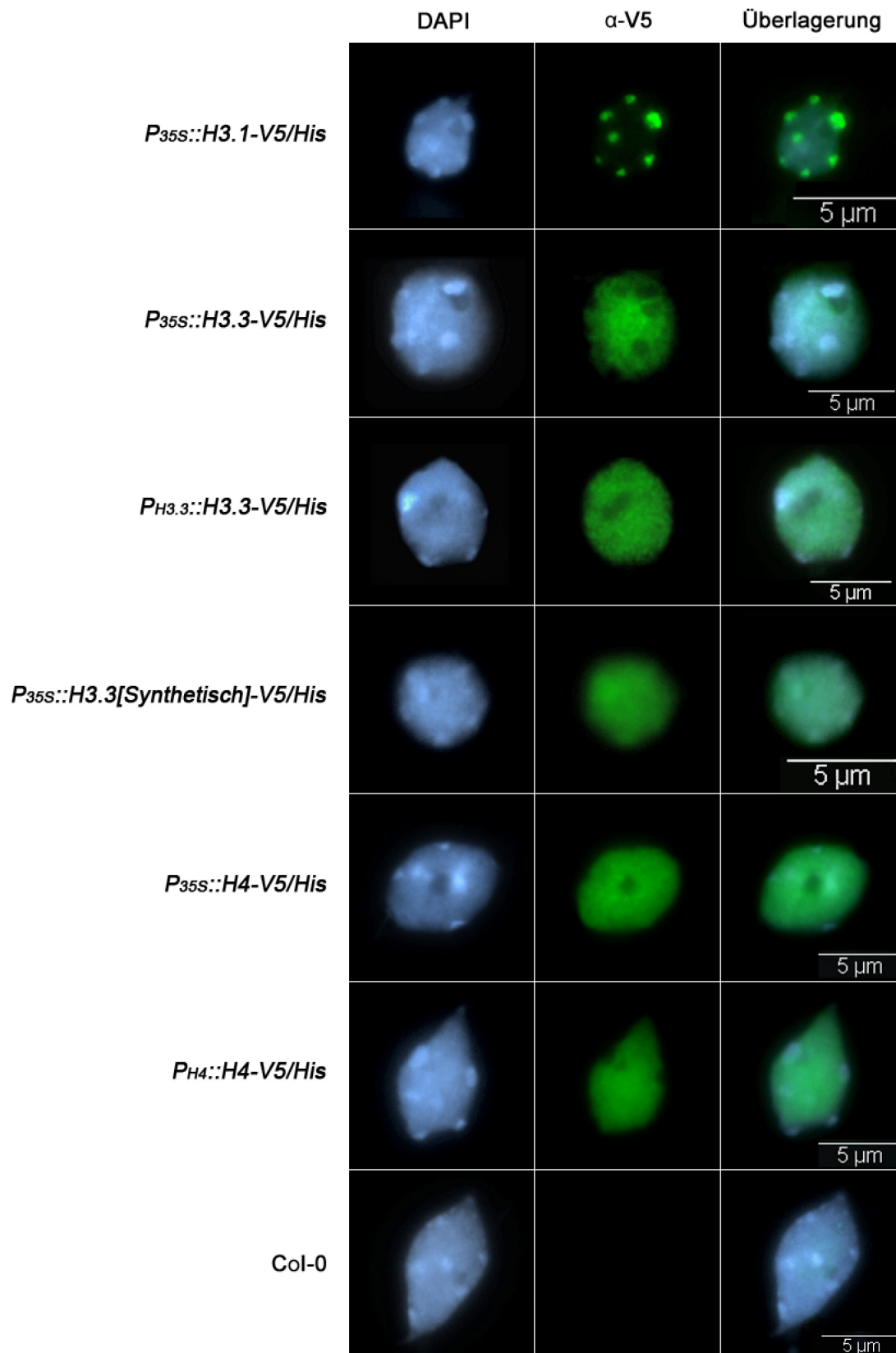
Die Differenzierung von transgenen Pflanzen erfolgte durch Aussaat der Samen und Isolation über BASTA<sup>®</sup>-Resistenz nach Auskeimung im Keimblattstadium. Zur Selektion von Linien mit nur einer T-DNA-Insertion wurden mehrere Einzelpflanzen aus der F2 ausgewählt und auf eine T-DNA Segregation überprüft. Pflanzen mit einer 1:3 Aufspaltung nach BASTA<sup>®</sup>-Behandlung wurden anschließend zum Aufbau von homozygoten T-DNA-Insertionslinien verwendet. Diese isolierten homozygoten Linien *P35S::H3.3-V5/His*, *P35S::H4-V5/His*, *PH3.3::H3.3-V5/His*, *PH4::H4-V5/His* zeigen keinen spezifischen, vom Wildtyp abweichenden, Phänotyp.

### 3.2.2 Spezifische euchromatische und heterochromatische Assoziation der V5/His fusionierten Histonvarianten

Es konnte in vorausgehenden immunozytologischen Analysen eine Assoziation des unter der Kontrolle des 35S-Promoters liegenden H3.1-V5/His-Fusionsproteins mit den heterochromatischen Chromozentren gezeigt werden (Gläser 2010). Zum Nachweis der in dieser Arbeit klonierten Histonfusionskonstrukte und zur Analyse der Lokalisation der verschiedenen Fusionsproteine wurden ebenfalls immunozytologische Färbungen durchgeführt.

Nach Anfärbung der Interphasekerne von *Arabidopsis* mit DAPI sind die heterochromatischen Chromozentren als helle Strukturen sichtbar (Abb. 3.20), da sich die heterochromatischen Bereiche durch einen höheren AT-Gehalt auszeichnen und der DNA-Farbstoff DAPI präferentiell AT-reiche Bereiche färbt (Fransz *et al.*, 2002).





**Abb. 3.20: Spezifische eu- und heterochromatische Lokalisation der H3.1, H3.3 und H4-Histonfusionsproteine unter der Kontrolle verschiedener Promotoren.** Immunocytochemische V5-Färbung von Interphasekernen der verschiedenen homozygoten Histonlinien unter der Kontrolle von endogenen Promotoren (*PH3.3*, *PH4*) oder des *35S*-Promotors (*P35S*). Dargestellt ist die DNA-Färbung mit DAPI (hellblau), die V5-Antikörperfärbung (grün) und die Überlagerung beider Färbungen.

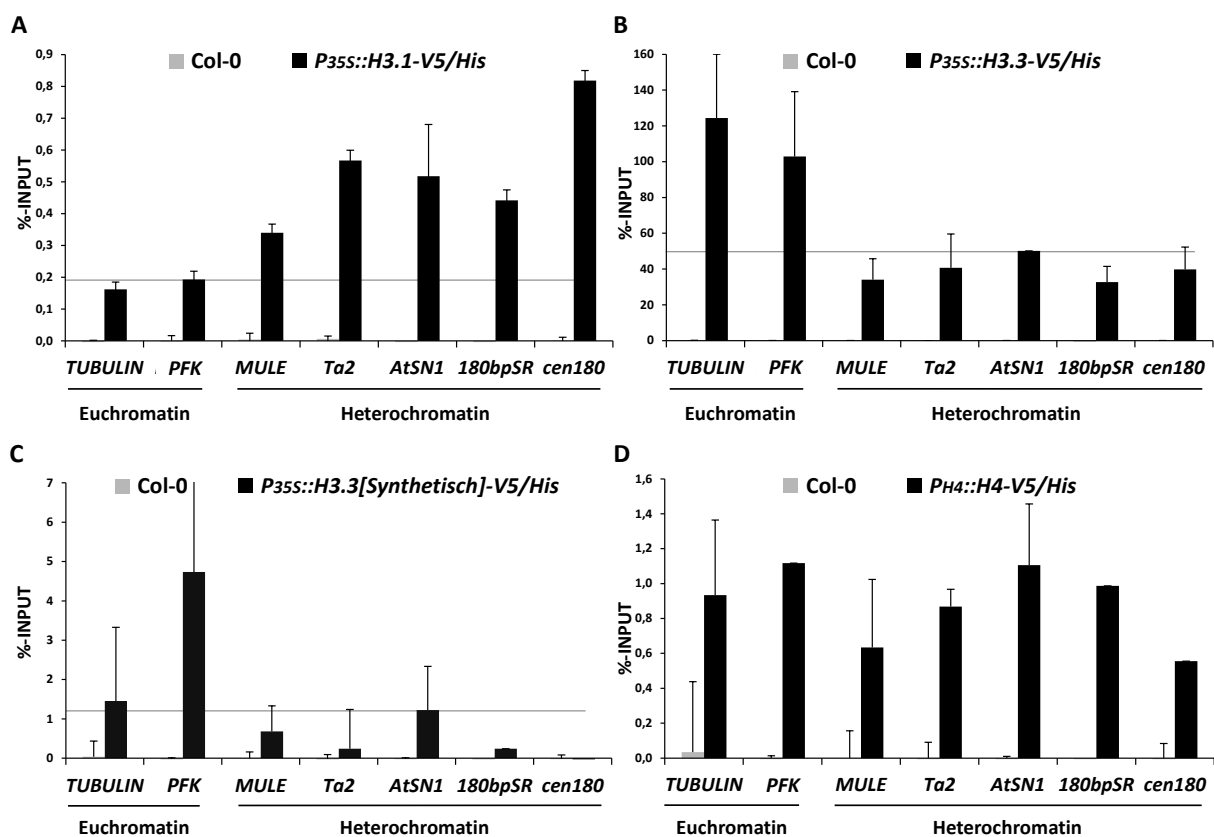
Entsprechend der Chromosomenzahl von  $2n=10$  in diploiden Interphasekernen können nach der DAPI-Färbung maximal 10 Chromozentren im Wildtyp nachgewiesen werden (Fransz *et al.*, 2002). Zur Lokalisationsanalyse der V5/His-Fusionshistone wurden Interphasekerne der verschiedenen transgenen Pflanzen mit einem Antikörper, der spezifisch für den V5-Tag ist, gefärbt.

Keine V5-Färbung ist in Interphasekernen der Wildtyp-Kontrolle Col-0 nachzuweisen (Abb. 3.20). Für das H3.1-V5/His Protein unter der Kontrolle des 35S-Promotors konnte die heterochromatische Assoziation in den Chromozentren bestätigt werden (Abb. 3.20; Gläser 2010). Im Gegensatz dazu ist in der Linie *P35S::H3.3-V5/His* das H3.3-Fusionsprotein euchromatisch lokalisiert (Abb. 3.20). Das H3.3-V5/His Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen *H3.3*-Promotors zeigt ebenfalls eine euchromatische Verteilung in den Interphasekernen wie das unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierte H3.3-V5/His Fusionsprotein (Abb. 3.20). Die Wahl des Promotors scheint somit keinen Einfluss auf die Lokalisationsverteilung des H3.3-Fusionsproteins in Interphasekernen von *Arabidopsis* zu haben. Ebenfalls eine euchromatische Verteilung zeigt das synthetische H3.3-V5/His Fusionsprotein unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Das H4-V5/His-Fusionsprotein in der Linie *P35S::H4-V5/His* und in der Linie *PH4::H4-V5/His* ist ebenfalls sowohl in den euchromatischen Bereichen, als auch in den heterochromatischen Chromozentren zu finden (Abb. 3.20).

Mittels ChIP und anschließender *Real-Time*-PCR sollte die in den immunozytologischen Färbungen gefundenen spezifischen eu- und heterochromatischen Lokalisationen der verschiedenen Histonfusionsproteine überprüft und quantifiziert werden. Dazu wurde die Assoziation der Fusionshistone an den im Euchromatin liegenden und konstitutiv exprimierten Genen  *$\alpha$ -TUBULIN* und *PHOSPHOFRUKTOKINASE (PFK)* analysiert. Als Kontrollgene für heterochromatische Sequenzen wurden die Transposons *MULE*, *Ta2*, *AtSNI* sowie das perizentromere *180bp-SINGLE-REPEAT (180bpSR)* und das zentromere *180bp-REPEAT (cen180)* ausgewählt (Abb. 3.21). Die zentromere Kernregion von *Arabidopsis* ist vorrangig aus unzähligen *Repeats* des 180 bp-Elements aufgebaut (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Nagaki *et al.*, 2003). In der perizentromeren Region sind viele Kopien von Retroelementen, wie den 170 bp SINE Retrotransposon *AtSNI* und den DNA-Transposons *MULE* und *Ta2*, lokalisiert (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000; Johnson *et al.*, 2007).

Die Assoziation von H3.1-V5/His an den euchromatischen Genen  $\alpha$ -TUBULIN und PHOSPHOFRUKTOKINASE ist vergleichbar (Abb. 3.21 A). An dem heterochromatischen Transposon MULE wurde im Vergleich dazu doppelt so viel H3.1-V5/His nachgewiesen. Noch höher ist die Assoziation am Transposon Ta2 und am 180bp-SINGLE-REPEAT (180bpSR). Am zentromeren 180bp-REPEAT (cen180) ist die Assoziation sogar viermal so hoch wie an den beiden untersuchten euchromatischen Genen. Das H3.1-V5/His-Protein zeigt somit eindeutig eine präferentielle Assoziation an Genen, die im Heterochromatin liegen (Abb. 3.21 A). Somit kann die in den zytologischen Färbungen gefundene heterochromatische Assoziation von H3.1-V5/His eindeutig bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu konnte für das Fusionsprotein H3.3-V5/His eine präferentielle Assoziation an den im Euchromatin gelegenen Genen  $\alpha$ -TUBULIN und PHOSPHOFRUKTOKINASE (PFK) nachgewiesen werden (Abb. 3.21 B). Die %-Inputwerte an den beiden euchromatischen Genen sind fast fünfmal so hoch wie an den untersuchten perizentromeren Transposons, am 180bp-SINGLE-REPEAT (180bpSR) und am cen180-Element.



**Abb. 3.21: Spezifische euchromatische und heterochromatische Assoziation der Histonfusionsproteine H3.1-V5/His, H3.3-V5/His, H3.3[Synthetisch]-V5/His und H4-V5/His.** Nachweis von Fusionshistonen an euchromatischen und heterochromatischen Sequenzen mittels ChIP. Zur Präzipitation wurde ein V5-Antikörper verwendet. (A) H3.1-V5/His ist präferentiell an heterochromatischen Sequenzen assoziiert. (B) H3.3-V5/His ist präferentiell an euchromatischen Sequenzen lokalisiert. (C) H3.3[Synthetisch]-V5/His zeigt ebenfalls eine präferentielle euchromatische Lokalisation. (D) H4-V5/His ist sowohl euchromatisch als auch heterochromatisch lokalisiert. Die Querlinie definiert die %-Inputgrenze zwischen Eu- und Heterochromatin. Durch Fehlerbalken werden die Standardabweichungen angegeben (n=3).

Im direkten Vergleich der %-Inputwerte wurde für das H3.3-V5/His im Vergleich zu dem H3.1-V5/His eine fast zehnmal höhere Assoziation an den Zielsequenzen gefunden. Es wird somit mehr H3.3-V5/His exprimiert oder in Nukleosomen eingebaut, als im Vergleich zu dem H3.1-V5/His (Abb. 3.21 A und B). Auch das synthetische H3.3-V5/His zeigt eine erhöhte Assoziation am euchromatischen *PFK*-Gen im Vergleich zu den untersuchten Transposons und *Repeats*. Allerdings ist die Menge der präzipitierten Sequenzen deutlich geringer als das H3.3-Fusionsprotein (Abb. 3.21 B und C).

Das H4-Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen Promotors ist sowohl an den euchromatischen Genen *α-TUBULIN* und *PHOSPHOFRUKTOKINASE*, als auch in vergleichbarer Menge an den untersuchten Transposons und *Repeat*-Sequenzen assoziiert (Abb. 3.21 D).

### 3.2.3 Isolation und Aufreinigung von H3.1-V5/His

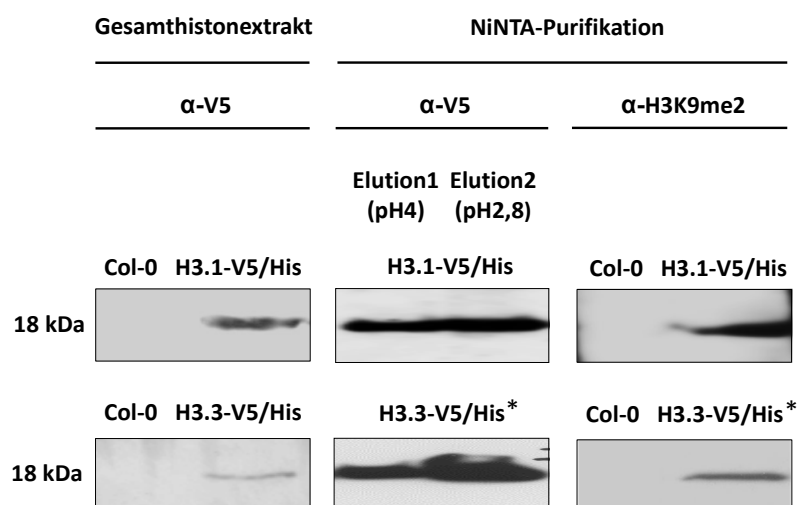
Eine wichtige Voraussetzung für die massenspektrometrischen Analysen von N-terminalen Modifizierungen an Histonen von *Arabidopsis* ist die spezifische Isolation und Aufreinigung der zu untersuchenden Histone. Es konnte in Vorversuchen bereits das H3.1-V5/His-Fusionsprotein in Gesamthistonextrakten aus 1 g Blattmaterial mit einem V5-spezifischen Antikörper im *Western-Blot* detektiert werden. Ein Nachweis von Modifikationen am H3.1-V5/His mittels *Western-Blot*-Analysen war jedoch mit dieser Isolationsmethode nicht möglich (Gläser 2010).

Zur spezifischen Isolierung und Aufkonzentration wurde deshalb eine V5-Immunopräzipitation und eine NiNTA-Isolation aus 5 g Blattmaterial der Linien *P35S::H3.1-V5/His* und *P35S::H3.3-V5/His* durchgeführt. Es konnte allerdings nur im Eluat der NiNTA-Aufreinigung das Histon H3.1-V5/His über einen V5-spezifischen *Western-Blot* nachgewiesen werden. Die Menge an isoliertem H3.1-V5/His-Protein war allerdings zu gering, um nachfolgende massenspektrometrische Analysen vornehmen zu können (Gläser 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb in Kooperation mit D. Demidov (IPK, Gatersleben) eine Methode zur Isolation der Fusionshistone im großen Maßstab entwickelt. Zunächst wurde pflanzliches Gesamtprotein aus dem Blattmaterial von *Arabidopsis* präpariert und die Histone mit Hilfe der sauren Fällung angereichert. Die erhaltene Lösung wurde zunächst auf die Anwesenheit von Fusionshistonen überprüft und ein *Western-Blot* mit einem V5-spezifischem Antikörper durchgeführt (Abb. 3.22).

In den Linien *P35S-H3.1-V5/His* und *P35S-H3.3-V5/His* konnten die 18 kDa großen H3.1-V5/His- und H3.3-V5/His-Fusionsproteine im *Western-Blot* nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Das endogene Histon H3.1 hat im Vergleich dazu eine Größe von 15 kDa. Im Histonextrakt des Wildtyps Col-0 ist kein V5-Fusionsprotein nachweisbar (Abb. 3.22). Die Aufreinigung der Fusionshistone erfolgte anschließend mit Hilfe des His-Tags über die Bindung an NiNTA-Beads. Die abschließende Elution wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten des Elutionspuffers in absteigender Reihenfolge durchgeführt. In den Elutionsfraktionen mit einem pH-Wert von 4,0 und 2,8 konnten im V5-spezifischen *Western-Blot* die über den His-Tag aufgereinigten Fusionshistone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Der größte Proteinanteil wurde bei einem pH-Wert von 2,8 von den Beads eluiert.

Es wurden zusätzlich auch ein *Western-Blot*-Analysen mit Antikörpern gegen verschiedene Histonmodifizierungen durchgeführt. Zunächst konnte für die beiden Fusionsproteine H3.1-V5/His und H3.3-V5/His eine H3K9-Dimethylierung nachgewiesen werden (Abb. 3.22). In Kooperationsarbeit wurden von D. Demidov an den H3.1- und H3.3-Fusionsproteinen noch die Modifizierungen H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27me1, H3K9ac und H3K27ac detektiert (D. Demidov, pers. Mitteilung). Es wurde somit gezeigt, dass auch die Histonfusionsproteine H3.1-V5/His und H3.3-V5/His posttranslationalen Histonmodifizierungen unterliegen, welche nun in massenspektrometrischen Analysen untersucht und quantifiziert werden können.



**Abb. 3.22: Immunozytologischer Nachweis der Fusionshistone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His und Nachweis von H3K9me2 an den Fusionshistonen.** Der Nachweis der Fusionshistone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His erfolgte in *Western-Blot*-Analysen mit einem V5-spezifischem Antikörper. In den linken *Western*-Bildern dargestellt ist der Nachweis der Fusionshistone in einem Gesamthistonextrakt. Die Histone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His wurden über NiNTA-Chromatographie spezifisch aufgereinigt und mit einem V5-spezifischem Antikörper in den Elutionsfraktionen mit pH 4 und pH 2,8 nachgewiesen. An den über NiNTA-Chromatographie isolierten Fusionshistonen H3.1 und H3.3 konnte die heterochromatische H3K9-Dimethylierung nachgewiesen werden. Mit \* gekennzeichnete *Western-Blot*-Analysen wurden in Kooperationsarbeit von D. Demidov durchgeführt. Col-0 wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

### 3.2.4 Kreuzung der Histonfusionskonstrukte mit TGS-Suppressormutanten

Mit Hilfe des *in vivo* Testsystems sollen weitere Histonmodifizierungen von H3 und H4, die am heterochromatischen Gen-Silencing des *LUC*-Transgens beteiligt sind, identifiziert werden. Es ist das Ziel, die finalen Prozesse des Silencing-Mechanismus am *LUC*-Repeat aufzuklären. Dazu müssen die Silencing-Suppressormutanten mit den Histonfusionslinien gekreuzt werden. Es wurde somit zunächst begonnen, die bereits sehr gut charakterisierte homozygote Linie *P35S::H3.1-V5/His* (Gläser 2010) mit verschiedenen homozygoten Silencing-Suppressorlinien zu kreuzen.

Zum Aufbau von stabilen Linien müssen sowohl das *V5/His*-Transgen als auch die Silencing-Suppressormutation und das *LUC*-Transgen in den Nachkommen homozygot vorliegen. Zur Selektion von Homozygoten wurden die Pflanzen der heterozygoten F1 geselbstet und die Nachkommen der F2 mit BASTA<sup>®</sup> besprüht. Damit wurden zunächst alle Pflanzen selektiert, die das Histon-V5/His-Transgen mit der integrierten BASTA<sup>®</sup>-Resistenz sowohl homozygot als auch heterozygot in das Genom eingebaut haben. Bei einer typischen 3:1 Segregation überlebten somit 75% der Pflanzen. Zur Selektion von homozygoten Silencing-Suppressormutanten wurde das ebenfalls im Genom integrierte *LUC*-Transgen verwendet. Die überlebenden und damit das *V5/His*-Transgen enthaltenen Pflanzen wurden somit auf die Anwesenheit des *LUC*-Repeats überprüft. Dazu wurde nach Besprühung der Pflanzen mit Luciferin die emittierte Chemilumineszenzstrahlung aufgenommen. Individuen, die homozygot für die Suppressormutation sind und mindestens ein *LUCIFERASE*-Transgen enthalten, zeigen einen Silencing-Suppressoreffekt und somit eine Luciferaseaktivität. Damit konnten die isolierten Pflanzen auf neun Genotypen reduziert werden. Nach Selbstung der F2 können anschließend die F3 analysiert und auf BASTA<sup>®</sup>-Resistenz überprüft werden. Sechs Genotypen der F2 zeigen in der F3 eine Aufspaltung von resistenten zu nicht resistenten Pflanzen. Drei Genotypen der F2 zeigen in der F3 hingegen eine vollständige BASTA<sup>®</sup>-Resistenz und sind damit homozygot für das Histonkonstrukt. Von diesen drei resistenten Genotypen weisen zwei Genotypen eine Aufspaltung der Luciferaseaktivität auf, nur ein Genotyp zeigt keine Aufspaltung. Dieser Genotyp trägt sowohl das Histonkonstrukt als auch die Suppressormutation und das *LUC*-Transgen homozygot.

Es wurden bisher Kreuzungen der Linie *P35S::H3.1-V5/His* mit Mutanten der Histon-Methyltransferasen SUVH1 und SUVH2 (*suvh1*, *suvh2*), mit der Mutante für die pflanzenspezifische DNA-Methyltransferase CHROMOMETHYLASE 3 (*cmt3-h1*, 7/2/11), mit der Mutante für die HISTONDEACETYLASE 6 (*hda6-h1*, 9/8/1), mit der Mutante für

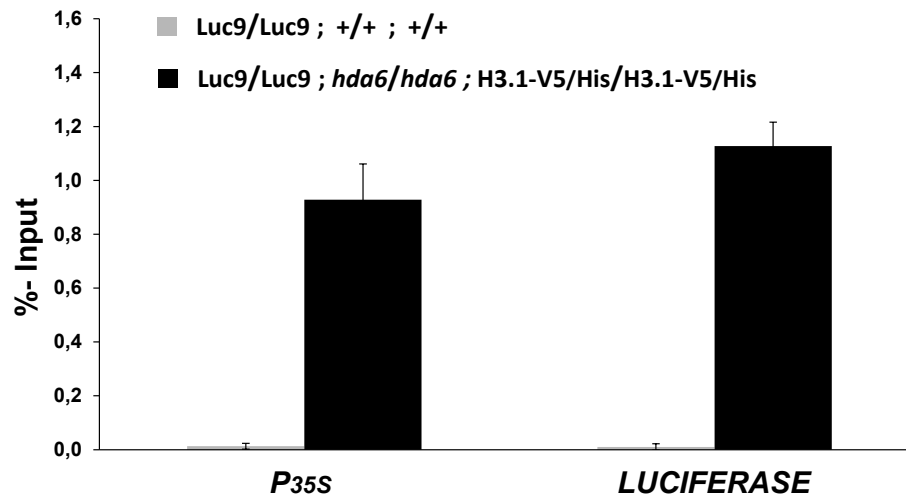
den Chromatin-Remodeling-Faktor DDM1 (*ddm1-h1*, 9/2/1), dem putativen Chromatin-Remodeling-Faktor ATRX1 (*atr1-h1*, 9/7/4), mit der Mutante für die RIBONUKLEOTIDREDUKTASE 1 (*rnr1-h1*, 12/1/3), für den WRKY-Transkriptionsfaktor TTG2 (*ttg2-h1*, 9/2/5) und für Kernprotein BRUSHY 1 (*bru1-2*, 6/8/1) durchgeführt. Die gekreuzten Pflanzen befinden sich in der F2 Generation. Neben der Kreuzung dieser Mutanten mit weiteren in dieser Arbeit hergestellten Histonfusionslinien sollen noch alle bisher im *LUC-Silencing*-System isolierten *Silencing*-Suppressormutanten gekreuzt werden. Damit wird die massenspektrometrische Analyse von Histonmodifizierungen an euchromatisch und heterochromatisch lokalisierten Histonvarianten in *Silencing*-Suppressormutanten ermöglicht.

### 3.2.5 Nachweis von H3.1-V5/HIS am *LUCIFERASE*-Locus

Eine wichtige Voraussetzung für die Aufklärung der finalen Prozesse des *Silencing*-Mechanismus am *LUC*-Repeat ist der Einbau der mit einem V5/His-Tag fusionierten Histonvarianten in Nukleosomen, die mit dem *LUC*-Transgen assoziiert sind. Zur Überprüfung der Assoziation von H3.1-V5/His mit dem *LUC*-Transgen wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem V5-Antikörper gegen den V5-Tag durchgeführt. Dazu wurde Blattmaterial aus einer Kreuzung der Linie *P35S::H3.1-V5/His* mit der *Silencing*-Suppressormutante *hda6-h1* (9/8/1) verwendet. Die *HDA6*-Mutante enthält das *LUC*-Transgen. Es wurden Pflanzen selektiert, die sowohl gegen BASTA® resistent sind und damit das Histonfusionskonstrukt im Genom integriert haben, als auch Lumineszenz aufweisen und damit auch das *LUC*-Transgen und die *HDA6*-Mutation enthalten. Mit der Analyse des *LUC*-Repeats im Mutantenhintergrund sollte zunächst sichergestellt werden, dass das *LUC*-Repeat in dieser Linie enthalten ist. Dies wird im Mutantenhintergrund aufgrund der detektierten Chemilumineszenz aufgezeigt. Als Negativkontrolle wurde Blattmaterial der Linie *Luc9* eingesetzt, welche das *LUC*-Transgen, aber kein Histonfusionskonstrukt enthält. Es konnte in der ChIP eine eindeutige Assoziation des H3.1-V5/His Fusionsprotein mit dem *35S*-Promotor und mit dem *LUC*-Locus nachgewiesen werden. In der Linie *Luc9* wurde im Gegensatz dazu mit dem V5-Antikörper kein *LUC*-Transgen-Fragment enthaltenes Chromatin präzipitiert (Abb. 3.23).

Das H3.1-V5/His wird somit auch im Mutantenhintergrund am *LUC*-Transgen in Nukleosome eingebaut, was eine wichtige Voraussetzung für die weiterführenden Analysen zur

Aufklärung der *Silencing*-Mechanismen am *LUC*-Transgen ist. Diese Analysen müssen für die Luc-Linien auch ohne Mutantenhintergrund überprüft werden.



**Abb. 3.23: Assoziation von H3.1-V5/His am *LUCIFERASE*-Locus.** Chromatin-Immunopräzipitation mit einem V5-Antikörper. Für die ChIP wurde Blattmaterial aus der Kreuzung der *P35S::H3.1-V5/His* Linie mit der *Silencing*-Suppressormutante *hda6-h1* verwendet. H3.1-V5/His ist eindeutig am *35S*-Promotor (*P35S*) und am *LUCIFERASE*-Gen eingebaut. Keine Präzipitation wurde in der Negativkontrolle Luc9 am *LUC*-Transgen detektiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an (n=3).



## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der epigenetischen Charakterisierung des in unserer Gruppe etablierten *LUCIFERASE-Silencing*-Systems in *Arabidopsis thaliana* und der mit diesem System isolierten *Silencing*-Suppressormutanten. Grundlegend für die Analyse der isolierten *Silencing*-Suppressormutanten war die Definition von epigenetischen Modifizierungen am *LUC*-Locus, die mit transkriptionellem Gen-*Silencing* (TGS) verbunden sind. Die im *LUC*-System gefundenen und in dieser Arbeit analysierten *Silencing*-Suppressormutanten umfassen dabei sowohl bereits bekannte am TGS beteiligte Faktoren als auch bisher unbekannte und neue Komponenten von TGS in *Arabidopsis*. Die Arbeiten an den transgenen Linien beruhten dabei auf zwei Schwerpunkten. Neben der Analyse von Transkripten und RNA-abhängigen Prozessen wurden ChIP-Analysen zur Identifizierung von Histonmodifizierungen durchgeführt. Durch diese Arbeiten sollten die epigenetischen Prozesse definiert werden, die mit TGS der *LUCIFERASE*-Gene in den transgenen Linien ursächlich in Verbindung stehen.

### 4.1 Die Rolle von nichtkodierenden RNA-Transkripten im Transkriptionellen Gen-*Silencing* des *LUCIFERASE*-Repeats

RT-Analysen belegen, dass in den Luc-Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12 transkriptionelles Gen-*Silencing* (TGS) der *LUC*-Repeats vorliegt (Abb. 3.2) und bestätigen vorhergehende *Run-On*-Transkriptanalysen (Hofmann 2004). In der Kontroll-Linie Luc1 mit einer *LUC*-Gen-Kopie und in der partiell inaktivierten Luc2 wird polyadenylierte *LUC*-mRNA synthetisiert. Beide Luc-Linien zeigen Biolumineszenz und damit eine sichtbare *LUCIFERASE*-Expression (Abb. 3.2). *Northern-Blot*-Analysen weisen allerdings *LUC*-mRNA mit einer Größe von 1,7 kb nur in der Kontroll-Linie Luc1, und nicht in der ein partiell inaktives *LUC*-Transgen enthaltenen Linie Luc2 nach (Schlensog 2012). Vermutlich liegt die Menge der *LUC*-mRNA in der Linie Luc2 im *Northern-Blot* unterhalb des Detektionsminimums.

Der Nachweis von *LUC*-RNAs mittels *random*-RT-PCR in allen untersuchten Luc-Linien, unabhängig von der Transkription oder Aktivität der *LUC*-Gene, deutete auf die Expression von nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) am *LUC*-Transgen hin (Abb. 3.2). Durch ein Fehlen dieser Transkripte in Mutanten der Polymerase V-Untereinheiten NRPE1 (größte Untereinheit) und NRPD2a (zweitgrößte Untereinheit) wurden die detektierten nichtkodierenden *antisense*- und *sense*-RNAs am *LUC*-Repeat als Polymerase V-abhängige Transkripte in strangspezifischen RT-PCRs identifiziert (Abb. 3.5). Diese Pol V-Transkripte

überspannen sowohl nichtkodierende 35S-Promotorbereiche als auch das kodierende *LUCIFERASE*-Gen (Abb. 3.2; Kapitel 3.1.5).

*Northern-Blot*-Analysen weisen nach, dass diese nichtkodierenden RNAs in den transkriptionell inaktiven *LUC*-Linien Luc6, Luc7, Luc8, Luc9 und Luc12 hochmolekulare *LUC*-RNA Transkripte mit einer Größe von 4-10 kb sind (Schlensog 2012). Die Gesamtgröße einer *LUC*-T-DNA mit vier 35S-Promotor-*LUC*-Genen und einem *NPT*-Gen beträgt 11,7 kb. (Hofmann 2004). Vermutlich transkribiert die RNA-Polymerase V die beiden jeweils vor und hinter den Selektionsmarker *NPT* als *Repeat* klonierten 35S-*LUC*-Expressionskassetten mit einer Größe von ca. 4,8 kb. Wahrscheinlich werden auch Vollängen-RNAs gebildet, die eine gesamte T-DNA überspannen und eine Größe von über 10 kb aufweisen.

In bisherigen Studien wurden Pol V-abhängige Transkripte an Transposons und repetitiven Elementen sowie an intergenischen Regionen (IGNs) nachgewiesen, die sowohl in heterochromatischer als auch in euchromatischer Umgebung lokalisiert sind (Kanno *et al.*, 2005; Wierzbicki *et al.*, 2008; Wierzbicki 2012; Zhong *et al.*, 2012). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die identifizierten nichtkodierenden Pol V-abhängigen Transkripte am *LUC*-Locus (Kapitel 3.1.5), genauso wie die Pol V-Transkripte an nichtkodierenden intergenischen Regionen (Wierzbicki *et al.*, 2008), kein Poly(A)-Signal aufweisen. Die multiplen 5'-Enden von Pol V-Transkripten, die sowohl in bisherigen RACE-Analysen (Wierzbicki *et al.*, 2008) als auch im Rahmen dieser Arbeit für die Pol V-abhängigen *antisense*-RNAs am *LUC7*-Transgen detektiert wurden (Abb. 3.7), legen nahe, dass die Polymerase V-Transkription vermutlich Promotor-unabhängig an multiplen Startpunkten initiiert wird. In einer genomweiten ChIP-Sequenzierung mit einem Antikörper gegen die große Untereinheit NRPE1 der Polymerase V wurden unter den Polymerase V-assoziierten Regionen Genbereiche identifiziert, welche die Konsensus-Sequenzen CCNCCNCCNCC (N=A oder T) oder GGNGGNGGNGG (N=A, T oder C) aufwiesen (Wierzbicki 2012). Da allerdings auch mehr als 50 % der Pol V-assoziierten Regionen nicht diese Konsensus-Sequenz aufwiesen (Wierzbicki 2012), scheint diese Sequenz somit nicht notwendig oder ausreichend zu sein, um eine Pol V-Assoziation an genomischen Sequenzen zu erklären. In der Sequenz des unter der Kontrolle des 35S-Promotors liegenden *LUCIFERASE*-Gens konnten weder CCNCCNCCNCC- bzw. GGNGGNGGNGG-Konsensus-Sequenzen, noch andere putative Sequenzmotive gefunden werden. Wie die Startpunkte der Pol V-Transkription erkannt werden ist somit weiterhin unklar. RACE-Analysen an *LUC*-Transgenen in anderen Luc-Linien und in *Silencing*-Suppressormutanten könnten weitere Pol V-Transkriptionsstartpunkte identifizieren und aufklären, wie stringent die gefundenen Pol V-

Startpunkte sind und ob sie durch Mutation verschiedener *Silencing*-Faktoren beeinflusst werden.

Parallel zur *LUC*-mRNA werden in den Suppressormutanten die nichtkodierenden Polymerase V-*antisense*-Transkripte am *LUC*-Repeat detektiert (Abb. 3.5). Vermutlich erfolgen die Synthesen von mRNA und *antisense*-RNA gleichzeitig, ohne dass sich die beiden Polymerasekomplexe der RNA-Polymerasen V und II direkt behindern oder die RNA-Polymerase V agiert vor oder nach der Synthese der RNA-Polymerase II. Allerdings werden in den untersuchten Suppressormutanten, mit Ausnahme von *mms19-h1* und *drd1-h1*, keine nichtkodierenden *sense*-Transkripte detektiert (Abb. 3.5). Am *AtSNI*-Locus schließen sich Pol V-Transkripte und die *AtSNI*-Transkripte, die wahrscheinlich von der Polymerase III synthetisiert werden, gegenseitig aus (Wierzbicki *et al.*, 2008). Wierzbicki *et al.* (2008) vermuteten, dass die Polymerase V-Transkription somit eine Transkription durch die Polymerase III unterbindet. Offensichtlich verhindert auch am *LUC*-Locus die Synthese der *LUC*-mRNA durch die RNA-Polymerase II eine Synthese der nichtkodierenden *sense*-RNAs durch die RNA-Polymerase V. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann spekuliert werden, dass in den *Silencing*-Suppressormutanten die Bindung und Syntheseaktivität der RNA-Polymerase V am *LUC*-Transgen nicht generell behindert wird, jedoch vermutlich durch die Bindung und Syntheseaktivität der RNA-Polymerase II beeinflusst ist. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Synthese der nichtkodierenden *sense*-RNAs für das transkriptionelle Gen-*Silencing* an den *LUC*-Repeats ein zentraler Schritt oder primäres Ereignis sein könnte.

Bisher unklar ist allerdings, warum in den Mutanten *mms19-h1* und *drd1-h1* sowohl *antisense*-Transkripte als auch mRNA und nichtkodierende *sense*-Transkripte detektiert werden (Abb. 3.5). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszufinden, ob es sich bei den nichtkodierenden *sense*-RNAs womöglich um aberrante mRNAs handelt, die durch eine Überlesung des Transkriptionsstoppsignals entstehen. Eventuell könnte auch eine Quantifizierung der Pol V-Transkripte mittels quantitativer RT-PCR aufklären, ob in den *Silencing*-Suppressormutanten und Luc-Linien unterschiedliche Mengen von nichtkodierenden Transkripten detektiert werden und eventuell dosisabhängige Effekte Einfluss auf TGS des *LUC*-Repeats haben. Es wäre auch möglich, dass in diesen Mutanten am *LUC*-Repeat ein partiell heterochromatischer Zustand vorliegt oder nicht alle *LUC*-Gene transkriptionell aktiv sind. Eine Differenzierung der vier *LUC*-Gene des *LUC*-Repeats ist bisher nicht möglich.

Besonders interessant ist die Wirkung einer *ASYMMETRIC LEAVES 1/2 ENHANCER 7*-Mutante (*ae7-h1*), in der nicht nur die nichtkodierenden *sense*-Transkripte, sondern auch die nichtkodierenden *antisense*-RNAs nicht mehr nachgewiesen werden können (Abb. 3.5). Vermutlich beeinflusst *ASYMMETRIC LEAVES 1/2 ENHANCER 7* (AE7) die Funktion der Polymerase V. Das AE7-Protein enthält eine sogenannte DUF59-Domäne (*domain of unknown function 59*) (Yuan *et al.*, 2010) und konnte als *myc*-Fusionsprotein an Chromozentren von *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Gerschke 2011). Das homologe Protein der Hefe Cia2/YHR122W ist an der Assemblierung von Eisen-Schwefel (Fe/S)-Clustern im Zytosol beteiligt (Weerapana *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012). Eisen-Schwefel (Fe/S)-Cluster sind anorganische Kofaktoren von zahlreichen Proteinen, die in DNA-Reparatur und DNA-Replikation involviert sind. Der RNA-Polymerasekomplex in Archaeobakterien ist als eine vereinfachte Form der eukaryotischen RNA-Polymerase II beschrieben (Hirata *et al.*, 2008). In der RNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Sulfolobus sulfataricus* konnte ein Fe/S-Cluster nachgewiesen werden (Hirata *et al.*, 2008). Die strukturellen Übereinstimmungen zwischen der RNA-Polymerase aus Archaeobakterien und den eukaryotischen Polymerasen II und V (Hirata *et al.*, 2008; Ream *et al.*, 2009) lassen die Vermutung zu, dass auch in der Polymerase V Fe/S-Cluster eine strukturelle und funktionelle Rolle spielen könnten. In diesem Zusammenhang ist bisher nichts in der Literatur beschrieben. Es wäre somit möglich, dass funktionell wichtige Komponenten der Polymerase V oder an der Rekrutierung der Polymerase V beteiligte Komponenten ein Eisen-Schwefel-Cluster für ihre Aktivität benötigen.

Neben AE7 wurde mit MMS19 ein weiterer Faktor im *LUC-Silencing*-System identifiziert, dessen homologes Hefe-Protein MET18 ebenfalls an der zytosolischen Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (CIA-Assemblierung) beteiligt ist (Gari *et al.*, 2012). In der *MMS19*-Mutante werden im Vergleich zu der *AE7*-Mutante allerdings noch nichtkodierende *sense*- und *antisense*-Pol V-Transkripte synthetisiert (Abb. 3.5). Mehrere Studien belegen eine direkte Interaktion von AE7 und MMS19 in *Arabidopsis* (Luo *et al.*, 2012). Im Vergleich zu den anderen Komplexpartnern des CIA-Assemblierungskomplexes sind in der Hefe allerdings *MMS19/MET18-knockout*-Mutanten lebensfähig (Kou *et al.*, 2008) und in *Arabidopsis* werden keine phänotypischen Veränderungen beobachtet (Luo *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass MMS19 und AE7 mit verschiedenen Proteinkomplexen interagieren (Couturier *et al.*, 2013). Dies lässt die Vermutung zu, dass AE7 wahrscheinlich auch an der Synthese von Pol V-Transkripten nur eine selektive Wirkung ausübt und MMS19 nicht an der Pol V-Transkript-Synthese involviert ist.

Die Ergebnisse von genetischen Test-Analysen, bei denen eine Einzelkopie einer *35S::LUCIFERASE*-Kassette in Luc-Linien mit einem transkriptionell inaktiven *LUC*-Repeat gekreuzt wurde, lassen zudem eine untergeordnete Rolle von in *trans* wirkenden *LUC*-spezifischen siRNAs vermuten (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Nachkommen der Linien Luc7 und Luc9 waren durch eine starke *LUCIFERASE*-Expression gekennzeichnet und die Linien Luc6 und Luc12 zeigten nur partielles Gen-*Silencing* der einzelnen *LUC*-Kopie. Im Gegensatz dazu wurden in der posttranskriptionell inaktivierten Linie Luc8 starke *trans-Silencing* Effekte nachgewiesen (I. Hofmann, pers. Mitteilung).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem eine das kodierende *LUC*-Gen überspannende, doppelsträngige RNA (dsRNA) in der Luc8, aber nicht in der transkriptionell inaktiven Linie Luc7 und in der *Silencing*-Suppressormutante *ddm1-h1* nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Polyadenylierte *LUC*-mRNA und durch die Pol V synthetisierte *antisense*-RNAs scheinen somit nur in der Linie Luc8 einen RNA-Doppelstrang (dsRNA) zu bilden. Eine Doppelstrangbildung zwischen nichtkodierender *LUC-sense*-RNA und *LUC-antisense*-RNA scheint sowohl in der posttranskriptionell inaktivierten Linie Luc8 als auch in den transkriptionell inaktivierten Luc-Linien nicht stattzufinden. Doppelsträngige RNAs induzieren durch RNA-Interferenz (RNAi) die Degradierung von homologen RNA-Sequenzen, indem sie von einem Ribonuklease III-Enzym (*DICER*) in siRNAs prozessiert werden (Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton und Baulcombe 1999). Diese *small interfering RNAs* (siRNAs) vermitteln anschließend die gezielte Eliminierung der homologen mRNA (Zamore *et al.*, 2000). Möglicherweise ist die hohe Anzahl der *LUC*-Repeats oder spezifische, bisher unbekannte, genomische Insertionsorte eine Ursache dafür, warum sich die Linie Luc8, trotz identischer Transgensequenz, im *Silencing* von den anderen transkriptionell inaktiven Linien unterscheidet und das *LUC*-Transgen über posttranskriptionelle Mechanismen inaktiviert wird (Hofmann 2004).

Korrelierend mit den Doppelstrang-Ergebnissen konnten in *Northern-Blot*-Analysen 21-nt und 24-nt kurze *LUC*-siRNAs in der Linie Luc8 detektiert werden (Schlensog 2012). Zur genaueren Quantifizierung wurden die Luc-Linien mittels RNA-Sequenzierung (Illumina *Deep Sequencing*) auf die Anwesenheit von *LUC*-siRNAs untersucht (I. Hofmann, pers. Mitteilung). In der Luc1 werden große Mengen an 21-nt, wenig 22-nt und keine 24-nt *LUC*-siRNAs synthetisiert. Dabei sind in der Luc1 die siRNAs ausschließlich auf die kodierende *LUC*-Region beschränkt, während in allen inaktiven Luc-Linien die siRNAs vom *35S*-Promotor, vom *LUCIFERASE*-Gen und von der PolyA-Region detektiert werden. In der Luc8 wurde sowohl eine hohe Anzahl an 21-nt, 22-nt als auch 24-nt siRNAs gefunden

(I. Hofmann, pers. Mitteilung). Die unterschiedlichen Größen der siRNAs sind eine Folge der Prozessierung von doppelsträngiger RNA durch verschiedene DICER-Proteine (Xie *et al.*, 2004). Die 21/22-nt siRNA-Klassen sind in posttranskriptionellem Gen-*Silencing* (PTGS) beteiligt. Diese siRNAs interagieren in der Linie Luc8 vermutlich mit der homologen mRNA und führen durch RNA-Interferenz zum *LUC*-mRNA-Abbau und PTGS (Zamore *et al.*, 2000). Dementsprechend werden die 21-nt und 22-nt siRNAs nur an kodierenden *LUC*-Regionen und nur in den Luc-Linien Luc1 und Luc8, welche polyadenylierte *LUC*-mRNA synthetisieren, in hohen Mengen nachgewiesen. Die 24-nt-siRNAs werden durch DICER-LIKE 3 (DCL3) prozessiert und sind an RNA-abhängiger DNA-Methylierung (RdDM) und transkriptionellem Gen-*Silencing* beteiligt (Nagano *et al.*, 2014; Kasschau *et al.*, 2007). Im Gegensatz zur Luc1 und zur Luc8 konnten in den transkriptionell inaktiven Luc-Linien (Luc6, Luc7, Luc9, Luc12) nur sehr geringe Mengen an 21-nt, 22-nt und 24-nt siRNAs nachgewiesen werden (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass TGS des *LUC*-Repeats unabhängig von 24-nt siRNAs verwirklicht wird. Es wurden zudem in dem *LUCIFERASE*-Mutantenscreen keine *Silencing*-Suppressormutanten isoliert, die wichtige RNAi-Proteine und Faktoren des siRNA-Syntheseweges betreffen (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Deswegen wurden T-DNA-Mutanten für die im siRNA-Syntheseweg beteiligten Faktoren RNA-POLYMERASE 2 (RDR2), ARGONAUTE4 (AGO4) und DICER-LIKE 3 (DCL3) (Zilberman *et al.*, 2003; Daxinger *et al.*, 2009, Haag *et al.*, 2012; Law *et al.*, 2011) mit den Linien Luc7 und Luc9 gekreuzt und auf *Silencing*-Suppressoreffekte überprüft. In diesen Linien konnte keine Reaktivierung des *LUCIFERASE*-Gens beobachtet werden (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass transkriptionelles Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat wahrscheinlich über siRNA-unabhängige *Silencing*-Mechanismen aufrechterhalten wird.

Im bisherigen Modellen rekrutieren die Pol V-Transkripte den 24-nt-siRNA-AGO4-Komplex an homologe Sequenzen, wodurch siRNA-abhängige DNA-Methylierung (RdDM) und TGS an diesen genomischen Zielbereichen etabliert wird (Wierzbicki *et al.*, 2008,2009, 2012; Law *et al.*, 2010a; Haag *et al.*, 2012). Die Analyse des Einflusses von Komponenten des siRNA-abhängigen DNA-Methylierungsmechanismus auf die Heterochromatinorganisation von Chromozentren in *Arabidopsis* ließ allerdings darauf schließen, dass die Polymerase V zwar an der Heterochromatisierung und am *Silencing* von perizentromeren Repeats beteiligt ist, aber dabei auch über einen bisher unbekanntem Funktionsweg, unabhängig vom gängigen Pol IV/24-nt-siRNA-DNA-Methylierungsmechanismus, agieren kann (Pontes *et al.*, 2009). Ein Verlust der Pol V- oder DRD1-Funktion führte zur Dekondensation von Heterochromatin

in Interphasekernen und korrelierte mit einer transkriptionellen Reaktivierung von spezifischen perizentromeren Repeats. Im Gegensatz dazu führte ein Funktionsverlust der in den 24-nt siRNA-Syntheseweg involvierten Faktoren Pol IV, RDR2 oder DCL3 zu keiner Dekondensation von Chromozentren (Pontes *et al.*, 2009). Einige transponible Elemente und perizentromere Repeats, wie *CEN-F*, *CEN-R*, *106B* und *CACTA*, werden durch die Pol V, in Kooperation mit der *maintenance*-METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), des SWI/SNF2-*like* Chromatin-*Remodeling*-Faktor DDM1 (DECREASE IN DNA METHYLATION 1) und DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) inaktiviert. Diese Inaktivierung ist unabhängig von den Funktionen der Pol IV, RDR2, DCL3, AGO4 oder der DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) (Pontes *et al.*, 2009; Wierzbicki *et al.*, 2008). In einer genomweiten Analyse überlappten zudem nur 56 % der Pol V-assoziierten Loci mit 24-nt siRNA-Syntheseloci und asymmetrischer CpNpN-Methylierung (Wierzbicki *et al.*, 2012).

Perizentromeres Heterochromatin und durch transkriptionelles Gen-*Silencing* resultierende heterochromatische Strukturen sind zudem sensitiv gegenüber RNase. Diese Beobachtung zeigt, dass RNA eine wichtige strukturelle Komponente von perizentromeren Heterochromatin in *Arabidopsis* ist (Pontes *et al.*, 2009). Die Pol V-Transkripte könnten auch als strukturelle RNAs fungieren oder an der Bildung von strukturellen Komplexen beteiligt sein, welche wiederum heterochromatische Komplexe binden oder rekrutieren. Eine strukturelle Funktion nichtkodierender RNAs wurde bereits bei der Kontrolle der Geschlechtschromosomen in Säugetieren und in *Drosophila* (Wutz 2003), bei der Bildung des Telomerase-Komplexes in der Hefe (Zapulla und Chech 2004) und bei der Organisation von perizentromeren Heterochromatin des Menschen beschrieben (Maison *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass die Pol V-Transkripte oder die Pol V-Transkription Einfluss auf Strukturen des Chromatins am *LUC*-Locus haben, welche nachfolgend von Heterochromatin-etablierenden Faktoren erkannt werden. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass die Pol V-Transkripte an der Etablierung von heterochromatischen Histonmodifizierungen und DNA-Methylierung beteiligt sind (Wierzbicki *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2012; Pontes *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2014). Die Polymerase V könnte dabei unabhängig vom Pol IV-24-nt siRNA-DNA-Methylierungsmechanismus agieren und transkriptionelles Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat vermitteln.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die Synthese von Polymerase V-Transkripten nicht ausreichend ist, um heterochromatisches Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat zu etablieren. Pol V-abhängige *antisense*-Transkripte werden am *LUC*-Repeat,

mit Ausnahme der *AE7*-Mutante, unabhängig vom aktiven oder inaktiven Zustand des *LUCIFERASE*-Gens, synthetisiert. Die epigenetischen Faktoren DDM1, ATRX1, RNR1, CMT3, TSL, DRD1 und MMS19 beeinflussen vermutlich nachfolgende Mechanismen des *Silencing*-Prozesses, wie Histonmodifizierungen, DNA-Methylierung oder Chromatin-*Remodeling*. Deshalb wurden mögliche Veränderungen von Histonmodifizierungen in den verschiedenen *Silencing*-Suppressormutanten mittels Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen (ChIP) überprüft.

#### **4.2 Der Einfluss von Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung auf das Transkriptionelle Gen-*Silencing* des *LUCIFERASE*-Repeats**

Durch Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen (ChIP) konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass ein *Silencing* des *LUC*-Repeats und der Grad der Inaktivierung mit spezifischen heterochromatischen Histonmodifikationen korreliert (Abb. 3.1). In vielfachen Studien wurden H3K4- und H3K36-Methylierungen sowie H3K9-Acetylierungen mit Euchromatin und Genaktivierung in *Arabidopsis* in Zusammenhang gebracht (Zhang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008; Earley *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2004).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden auch in der transkriptionell aktiven Linie *Luc1* eine signifikante Assoziation mit den euchromatischen Histonmodifizierungen H3K4me<sub>2</sub>, H3K4me<sub>3</sub>, H3K9ac und H3K36me<sub>2</sub> am *35S*-Promotor und in der untersuchten *LUC*-Region gefunden. Es wurden auch Di- und Trimethylierungen von H3K4 in den beiden transkriptionell inaktiven Linien *Luc7* und *Luc9* am *LUC*-Locus detektiert. Allerdings ist das H3K4-Methylierungslevel im Vergleich zu der untersuchten transkriptionell aktiven Linie *Luc1* sehr gering (Abb. 3.1). Genomweite Analysen belegen, dass H3K4me<sub>2</sub> generell an Genen in *Arabidopsis* assoziiert ist und die Anwesenheit dieser Modifizierung allerdings nicht immer mit einer Transkriptionsaktivierung korreliert (Alvarez-Venegas und Avramova 2005; Zhang *et al.*, 2009). Zudem wurde bereits an einigen Loci intermediäres Heterochromatin beschrieben, die mit H3K9me<sub>2</sub> und H3K4me<sub>2</sub> assoziiert sind (Habu *et al.*, 2006).

Die H3K9-Dimethylierung ist in *Arabidopsis* die am häufigsten vorkommende Histon-Methylierung und wird in hohen Mengen vor allem an heterochromatischen Sequenzen, wie Transposons, Pseudogenen und Repeats, detektiert (Johnson *et al.*, 2002a; Tariq *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2005; Bernatavichute *et al.*, 2008). Das Lysin 9 am Histon H3 kann nicht zur gleichen Zeit acetyliert und methyliert vorliegen. Diese beiden Modifizierungen schließen sich am gleichen Histon damit aus (Lawrence *et al.*, 2004).



Mit zunehmendem Grad der Inaktivierung in der partiell aktiven Linie Luc2 kommt es zu einer Etablierung von heterochromatischen Histonmodifizierungen an den *LUC*-Repeats, die in den transkriptionell inaktiven Linien Luc7 und Luc9 in einer erhöhten Assoziation mit den heterochromatischen Histonmethylierungen H3K9me2 und H3K27me1 resultiert (Abb. 3.1).

Durch Bisulfit- und *Southern-Blot*-Analysen wurde bestätigt, dass eine erhöhte H3K9-Dimethylierung und H3K27-Monomethylierung am *LUC*-Locus in den Linien Luc7 und Luc9 mit einer erhöhten DNA-Methylierung an symmetrischen CpG- und CpNpG-Motiven und asymmetrischen CpN-Motiven (N=A, C oder T) am *LUCIFERASE*-Gen einhergeht (A. Fischer, pers. Mitteilung und Hofmann 2004). In der transkriptionell aktiven Linie Luc1 konnte neben der geringen H3K9-Dimethylierung und H3K27-Monomethylierung (Abb. 3.1) nur eine sehr geringe Menge an DNA-Methylierung am *LUC*-Locus nachgewiesen werden (A. Fischer, pers. Mitteilung). Die Assoziation der DNA-Methylierung am *LUC*-Gen ist in den transkriptionell inaktiven Linien Luc7 und Luc9, im Vergleich zu der transkriptionell aktiven Linie Luc1, um ein Zehnfaches erhöht (A. Fischer, pers. Mitteilung).

TGS ist mit DNA-Hypermethylierung verbunden, was unter anderem an *35S-GUS*-Transgenen (Morel *et al.*, 2000, Probst *et al.*, 2004) und am *35S-HPT*-Transgen nachgewiesen wurde (Baubec *et al.*, 2010; Mittelsten Scheid *et al.*, 2003). ChIP-Analysen belegen zudem H3K9-Dimethylierungen und reduzierte H3K4-Trimethylierungen im Promotor des transkriptionell inaktivierten *35S-HPT*-Transgens (Baubec *et al.*, 2010). Beim TGS von endogenen ribosomalen DNA-Repeats (rDNA-Repeats) sind ebenfalls DNA-Methylierungen, H3K9-Dimethylierungen, H3K4-Hypomethylierungen sowie Hypoacetylierungen von H3 und H4 beteiligt (Lawrence *et al.*, 2004). H3K27-Monomethylierung und H3K9-Dimethylierung korrelieren ebenfalls mit transkriptioneller Inaktivierung des transponiblen Retroelements *AtSN1* (*A. thaliana* *SINE* like element 1) (Wierzbicki *et al.*, 2008).

Heterochromatische Chromatinstrukturen werden am *LUC*-Repeat ebenfalls über DNA-Methylierung und heterochromatische Histonmodifizierungen zellerblich kontrolliert. Die Pol V-Transkripte scheinen TGS des *LUC*-Repeats zu fördern, welches mit repressiven Chromatin-Modifikationen, wie H3K9 Dimethylierung und H3K27-Monomethylierung sowie mit DNA-Methylierung in den Sequenzmotiven CpG, CpNpG und CpNpN, verbunden ist.

### 4.3 Die Etablierung von heterochromatischem Gen-Silencing am *LUC*-Repeat und daran beteiligte Faktoren

Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass die Inaktivierung der *LUCIFERASE*-Repeats durch TGS etabliert wird. Die Kombination von spezifischen Histonmodifizierungen und DNA-Methylierung hat Einfluss auf die Chromatinstruktur und auf die Regulation der Transkription am *LUC*-Locus. An den *LUCIFERASE*-Repeats finden somit umfangreiche heterochromatische Prozesse statt, die zum transkriptionellem Gen-Silencing (TGS) des *LUC*-Transgens beitragen. Die Isolation von *Silencing*-Suppressormutanten ermöglichte die Identifikation verschiedener Faktoren, die im transkriptionellen Gen-Silencing der *LUC*-Repeats involviert sind. Bisher konnten 25 Mutationsorte mittels SSLP-Marker und Illumina-Sequenzierung in den Suppressormutanten kartiert werden, die sich auf 18 verschiedene Gene verteilen (Hofmann 2004; I. Hofmann, pers. Mitteilung). Es wurden insgesamt 11 *Silencing*-Suppressormutanten auf Veränderungen von Histon-Methylierungen und DNA-Methylierungen untersucht, die sich aufgrund der detektierten Veränderungen dieser epigenetischen Modifizierungen in verschiedene Klassen gruppieren lassen.

Die Mutanten für den Chromatin-*Remodeling*-Faktor DDM1 und für die DNA-Methyltransferasen MET1 und CMT3 zeigen nicht nur Reduktionen der heterochromatischen Methylierungen H3K9me2 und H3K27me1 (Abb. 3.14 und Abb. 3.15), sondern auch in Bisulfit- und *Southern-Blot*-Analysen einen Verlust der CpG, CpNpG und/oder CpNpN-Methylierung am *LUC*-Repeat (Hofmann 2004; Thümmel 2004; Fiedler 2007; A. Fischer, pers. Mitteilung). Zudem sind diese drei Suppressormutanten durch eine signifikante Erhöhung der euchromatischen Modifizierungen H3K4me2 und H3K9ac am *LUC*-Repeat gekennzeichnet (Abb. 3.12 und Abb. 3.13), was mit einer Reaktivierung des *LUC*-Repeats korreliert. MET 1, CMT3 und DDM1 sind bekannte Chromatinfaktoren und in Transposon- und Transgen-*Silencing*-Prozesse involviert.

Das *Arabidopsis* Gen **DDM1 (DECREASED DNA METHYLATION 1)** kodiert für einen SWI/SNF ähnlichen, ATP-abhängigen Chromatin-*Remodeling*-Faktor, welcher in Hefe entdeckt wurde und die Heterochromatinassoziation von DNA-Methyltransferasen, Histon-Methyltransferasen und weiteren Proteinen kontrolliert (Probst *et al.*, 2003; Gendrel *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002a; Zemach *et al.*, 2013). *DDM1*-Mutanten sind durch einen Verlust der globalen DNA-Methylierung und durch Hypomethylierungen von zentromeren und perizentromeren Repeats und transponiblen Elementen in CpG- und nicht-CpG-Motiven,

Reaktivierung transgener Loci und einer Dekondensation des zentromeren Heterochromatins charakterisiert (Probst *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2002a; Gendrel *et al.*, 2002; Stroud *et al.*, 2013). Vorrausgehende Studien belegen zudem, dass Mutationen in *DDM1* im Heterochromatin zu einer Änderung des Histon-Methylierungsmusters von H3K9 zu H3K4 an spezifischen Genen führen (Probst *et al.*, 2003; Gendrel *et al.*, 2002).

Ein Funktionsverlust von DDM1 in der Mutante *ddm1-h1* (Q 460 #) führt auch am *LUC*-Locus zu einem Verlust der DNA-Methylierung in symmetrischen und asymmetrischen Sequenzmotiven (Hofmann 2004; A. Fischer, pers. Mitteilung), zur Dekondensation von Chromozentren (Thümmeler 2004, Irmeler 2006) und zur Reduktion der heterochromatischen Histon-Methylierungen H3K9me2 und H3K27me1 (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Für die putative SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9-homologe (SUVH)-Histonmethyltransferase SUVH2 belegen genetische Interaktionsstudien eine von DDM1 abhängige Funktion im heterochromatischen Gen-Silencing des *LUC*-Transgens (Naumann *et al.*, 2005).

DDM1 spielt damit nicht nur eine bedeutende Rolle beim Gen-Silencing von Retrotransposons, repetitiven Genen und Transgenen (Furner *et al.*, 1998; Mittelsten Scheid *et al.*, 1998; Hirochika *et al.*, 2000), sondern auch beim Gen-Silencing des transgenen *LUC*-Repeats. Die Chromatin-Remodeling-Aktivität von DDM1 scheint damit auch am *LUC*-Repeat die Zugänglichkeit von Histon-Methyltransferasen (SUVHs) und *maintenance*-Methylierungen durch DNA-Methyltransferasen am Chromatin zu ermöglichen.

Die METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) katalysiert die *maintenance*-CpG-Methylierung (Saze *et al.*, 2003; Finnegan *et al.*, 1993). Mutanten für *MET1* zeigen dementsprechend einen genomweiten Verlust der CpG-Methylierung an *single copy*- und repetitiven DNA-Sequenzen (Finnegan *et al.*, 2000; Stroud *et al.*, 2013). In der Mutante *met1-h1* (E 1272 K) ist ebenfalls die CpG-Methylierung komplett aufgehoben und auch eine Reduktion der Methylierung in CpNpG-Motiven am *LUC*-Repeat nachweisbar (Naumann *et al.*, 2005). Es wird postuliert, dass die Reduktion der CpNpG-Methylierung eine indirekte Folge des Verlustes der CpG-Methylierung in *MET1*-Mutanten ist (Tariq *et al.*, 2003; Stroud *et al.*, 2013). CHIP-Analysen belegen zudem in *MET1*-Mutanten eine Reduktion von H3K9me2 und eine Erhöhung von H3K4me2 an perizentromeren repetitiven Sequenzen, Transposons (Mathieu *et al.*, 2005; Gendrel *et al.*, 2002; Soppe *et al.*, 2002; Tariq *et al.*, 2003) und ebenfalls in der Mutante *met1-h1* am *LUC*-Repeat (Abb. 3.14 und Abb. 3.12).

Für die Histon-Methyltransferasen SUVH2, KYP/SUVH4 und SUVH6 wurde über die SRA-Domäne eine direkte Bindung an methylierte CpG-Motive nachgewiesen (Johnson *et al.*,

2007; Johnson *et al.*, 2008). Genetische Interaktionsanalysen belegen zudem für SUVH2 eine von MET1 abhängige Funktion am *LUC*-Transgen (Naumann *et al.*, 2005) und SUVH2 kontrolliert dabei dosisabhängig transkriptionelles Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats (Naumann *et al.*, 2005). MET1 katalysiert somit auch die *maintenance*-CpG-Methylierung am *LUC*-Repeat und ermöglicht durch die Bindung von SRA-Domänen enthaltenen SUVH-Methyltransferasen an methylierte CpG-Motive eine Dimethylierung von H3K9 und wahrscheinlich auch eine Monomethylierung von H3K27.

*In vivo*-Bindeanalysen konnten nachweisen, dass **CMT3 (CHROMOMETHYLASE 3)** über die Chromodomäne direkt mit dem N-terminalen Abschnitt des Histons H3 interagiert, wenn die Lysine 9 (H3K9) und 27 (H3K27) gleichzeitig methyliert sind. Somit stellen H3K9- und H3K27-Methylierungen durch SUVH-Proteine eine Voraussetzung für die symmetrische CpNpG-Methylierung durch CMT3 dar (Johnson *et al.*, 2002a; Lindroth *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2002). Die CHROMOMETHYLASE 3 gehört zu einer Klasse von pflanzenspezifischen Methyltransferasen, die durch Insertion einer Chromodomäne zwischen konservierten Motiven der Methyltransferasedomäne gekennzeichnet sind (Henikoff und Comai 1998). Bisher konnte für die H3K9-Methyltransferasen KRYPTONITE (KYP/SUVH4), SUVH5 und SUVH6 gezeigt werden, dass sie die CMT3-abhängige CpNpG-Methylierung kontrollieren (Ebbs und Bender, 2006; Stroud *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2002a; Lindroth *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2002).

Neben dem Verlust der symmetrischen CpNpG-Methylierung ist auch die asymmetrische CpNpN-Methylierung am *LUC*-Locus in der Punktmutante *cmt3-h1* (P 715 L) aufgehoben (Hofmann 2004; Naumann *et al.*, 2005). Genomweite Studien untermauern, dass in einer *CMT3*-Mutante der Verlust der CpNpG-Methylierung mit partiellen Verlusten von CpNpN-Methylierungen korreliert (Stroud *et al.*, 2013). Für verschiedene Loci (z.B. *SUPERMAN*) wurde bereits postuliert, dass *CMT3* partiell redundant mit den CpNpN-Methyltransferasen DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRMs) agiert (Cao und Jacobsen 2002; Stroud *et al.*, 2013). Die Analysen am *LUC*-Transgen zeigen, dass *CMT3* auch am *LUC*-Repeat sowohl symmetrische CpNpG- als auch asymmetrische CpNpN-Methylierung kontrolliert. Ebenso ist eine funktionelle Korrelation von *CMT3* mit der Chromomethylase *CMT2* möglich, denn neuste Studien belegen für *CMT2* eine RdDM-unabhängige CpNpN-Methylierungsfunktion (Zemach *et al.*, 2013). Es sollte somit überprüft werden, ob eine *CMT2*-Mutation eine *Silencing*-Suppression am *LUC*-Repeat bewirkt.

Mit **MMS19** wurde ein bisher unbekannter *Silencing*-Faktor in *Arabidopsis* identifiziert. In der Mutante *mms19-h1* (Q 724 #) sind ebenfalls die Methylierungen von H3K9me2 und H3K27me1 am *LUC*-Locus signifikant reduziert (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Es wurden auch Reduktionen in den symmetrischen DNA-Methylierungsmotiven CpG und CpNpG am Transgen detektiert (A. Fischer, pers. Mitteilung). Die *Silencing*-Suppression des *LUC*-Locus korrelierte dabei nicht mit signifikanten Anstiegen der euchromatischen Modifizierungen H4K4me2 und H3K9ac am *LUC*-Transgen in der *MMS19*-Mutante (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Die *MMS19*-Mutation führt Locus-spezifisch neben dem *LUC*-Repeat auch am *MULE*-Transposon zu einer transkriptionellen Reaktivierung (Abb. 3.18). Dekondensierte Chromozentren in Interphasekernen der Mutante *mms19-h1* (A. Fischer, pers. Mitteilung) lassen zudem eine Funktion von MMS19 in der Stabilisierung von heterochromatischen Strukturen vermuten. MMS19 scheint somit essentiell in der stabilen Aufrechterhaltung von TGS am *LUC*-Repeat zu sein, indem es symmetrische DNA-Methylierungen und die heterochromatischen Histon-Modifikationen H3K9me2 und H3K27me1 reguliert.

Mehrere Studien in *Arabidopsis* belegen eine direkte Interaktion von MMS19 mit dem ebenfalls am *LUC*-Repeat isoliertem *Silencing*-Faktor AE7 (Luo *et al.*, 2012). AE7 ist an der zytosolischen Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (CIA-Assemblierung) in *Arabidopsis* involviert (Luo *et al.*, 2012). Auch für das MMS19-homologe Protein MET18/MMS19 konnte in der Hefe eine Funktion in der CIA-Assemblierung nachgewiesen werden (Gari *et al.*, 2012). Es ist somit anzunehmen, dass die Funktion von einigen Chromatinfaktoren in *Arabidopsis* von Fe/S-Clustern abhängt und MMS19 an der CIA-Assemblierung beteiligt ist.

Wie schon im Kapitel 4.1/Seite 76 diskutiert, wurden im Gegensatz zur *AE7*-Mutante noch nichtkodierende *sense*- und *antisense*-Pol V-Transkripte am *LUC*-Locus in der *MMS19*-Mutante nachgewiesen. Im Vergleich zu den anderen Komplexpartnern des CIA-Assemblierungskomplexes sind in der Hefe zudem *MMS19/MET18-knockout*-Mutanten lebensfähig (Kou *et al.*, 2008) und in *Arabidopsis* werden keine phänotypischen Veränderungen beobachtet (Luo *et al.*, 2012). Es wird deshalb vermutet, dass MMS19 und AE7 mit verschiedenen Proteinkomplexen interagieren (Couturier *et al.*, 2013).

In *Saccharomyces cerevisiae* ist MET18/MMS19 außerdem durch die Assemblierung von Fe/S-Cluster enthaltenen Apoproteinen in DNA-Reparaturprozesse, DNA-Replikation und Genomstabilisierung involviert (Lauder *et al.*, 1996). *MET18/MMS19*-Mutanten sind zudem sensitiv gegenüber genotoxischem Stress, beispielsweise durch Methylmethansulfonat (MMS) (Prakash und Prakash 1977). Es wurde postuliert, dass MET18/MMS19 in der Hefe die

Transkription der Polymerase II beeinflusst, indem es die Aktivität des Transkriptionsfaktors TFIIH reguliert (Lauder *et al.*, 1996) und die Entfernung von abnormalen DNA-Strukturen ermöglicht (Lobachev *et al.*, 2000). Reparaturprozesse und Transkription beinhalten nachfolgend eine Reassemblierung der zuvor aufgelösten Chromatinstrukturen, an denen auch *Silencing*-Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. In weiterführenden Analysen sollte geklärt werden, ob MMS19 über DNA-Reparatur involvierte Chromatinstabilisierung oder über CIA-Assemblierung direkt oder indirekt transkriptionelles Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat aufrechterhält.

In einer dritten Gruppe von Mutanten, zu der *nRPD2a-h3* und *icu2-h1* gehören, ist H3K9me<sub>2</sub>, aber nicht H3K27me<sub>1</sub>, reduziert (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Diese Suppressormutanten zeigen zudem schwache Reduktionen der DNA-Methylierung in CpG-, CpNpG- und CpNpN-Motiven am *LUC*-Repeat (Kummer 2010; A. Fischer, pers. Mitteilung).

***NRPD2a*** kodiert für die zweitgrößte katalytische Untereinheit der Polymerase IV und Polymerase V (Onodera *et al.*, 2005). Sowohl in der Mutante *nRPD2a-h3* als auch in einer weiteren isolierten *NRPD2a*-Mutante (*nRPD2a-h1*) und in zwei Mutanten der großen Pol V-Untereinheit NRPE1 (*nrpe1-h1* und *nrpe1-h2*) konnten in Bisulfit-Analysen signifikante Reduktionen der DNA-Methylierung in allen Sequenzmotiven am *LUC*-Repeat detektiert werden (Kummer 2010; A. Fischer, pers. Mitteilung). Die symmetrische und asymmetrische DNA-Methylierung in den Sequenzmotiven CpG, CpNpG und CpNpN ist somit am *LUC*-Repeat von der Aktivität der Pol V abhängig.

In der Mutante *nRPD2a-h3* (W 1012 #) konnten zudem keine *antisense*-Transkripte am *LUC*-Locus nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Durch die Synthese dieser Pol V-Transkripte werden offensichtlich euchromatische Histonmethylierungen am *LUC*-Transgen verhindert, denn die Abwesenheit dieser Pol V-Transkripte führt zu einem signifikanten Anstieg von H3K4-Dimethylierungen und H3K9-Acetylierungen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Auch in anderen Analysen führte die Mutation der Polymerase V nicht nur zu einem Ausfall der Synthese von nichtkodierenden RNAs, sondern auch zu signifikanten Reduktionen der heterochromatischen Methylierungen H3K9me<sub>2</sub> und H3K27me<sub>1</sub>, zu einem Anstieg der euchromatischen Acetylierungen von H3K9 und H3K4 sowie zu einem Verlust der DNA-Methylierung an verschiedenen intergenischen Sequenzen, transponiblen Elementen und Repeats (Wierzbicki *et al.*, 2008; Huettel *et al.*, 2006). Die fehlende Pol V-Transkription hat allerdings nicht nur reduzierte H3K9-Dimethylierungen am *LUC*-Repeat (Abb. 3.12), sondern auch zytologisch sichtbar reduzierte H3K9-Dimethylierungen an den heterochromatischen

Chromozentren in Interphasekernen zur Folge (A. Fischer, pers. Mitteilung). Ein Funktionsverlust der Polymerase V beeinflusst somit nicht nur heterochromatische Chromatinstrukturen, sondern führt auch zu transkriptioneller Reaktivierung von spezifischen perizentromeren Repeats und Transposons (Pontes *et al.*, 2009). Expressionsanalysen belegen in allen untersuchten Mutantallelenn von NRPD2a und NRPE1 die Reaktivierung des Retrotransposons *AtSNI* (Abb. 3.18), welches eine bekannte Zielsequenz für siRNA-abhängige DNA-Methylierung und Pol V-Assoziation ist (Wierzbicki *et al.*, 2008, Zilberman *et al.*, 2003).

Interessanterweise konnte in der Mutante *ae7-h1* (L 107 F) ein Fehlen der Pol V-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.5), was auf eine funktionelle Interaktion von AE7 mit der Polymerase V schließen lässt. Jedoch konnte in der Suppressormutante *ae7-h1* keine Reaktivierung von *AtSNI* detektiert werden (Abb. 3.18). ChIP- und Bisulfit-Analysen am *LUC*-Locus könnten darüber Aufschluss geben, ob ein Funktionsverlust von AE7 zu den gleichen Veränderungen von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen führt, welche in Pol V-Mutanten nachgewiesen werden können.

Es wurde postuliert, dass der DDR-Komplex, bestehend aus DRD1, DMS3 und RDM1, die Polymerase V rekrutiert und ihre Assoziation an Zielsequenzen stabilisiert (Wierzbicki *et al.*, 2008; Law *et al.*, 2010a; Zhong *et al.*, 2012). Der Chromatin-Remodeling-Faktor DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1) konnte dabei ebenfalls als ein *Silencing*-Suppressor am *LUC*-Repeat identifiziert werden (Kummer 2010). Dies impliziert einen Ausfall der Pol V-Transkription in Abwesenheit von DRD1 durch disregulierte Rekrutierung des Pol V-Komplexes an das *LUC*-Transgen. In der Punktmutante *drd1-h1* (G 494 E) konnten allerdings noch Pol V-Transkripte am *LUC*-Locus nachgewiesen werden (Abb. 3.5). RNA-Analysen in der isolierten *knockout*-Suppressormutante *drd1-h2* könnten darüber aufklären, ob DRD1 für die Rekrutierung der Polymerase V und für die anschließende Transkription nichtkodierender RNAs am *LUC*-Repeat essentiell ist.

Neueste Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass durch Bindung der SRA-Domäne von SUVH2 und SUVH9 an methylierte DNA die Polymerase V ebenfalls an Zielsequenzen rekrutiert wird (Johnson *et al.*, 2014). Die H3K9-Dimethylierung wird durch die SUVH-Methyltransferase KRYPTONITE/SUVH4 zusammen mit SUVH5 und SUVH6 katalysiert (Jackson *et al.*, 2002; Ebbs und Bender 2006). Dies steht wiederum direkt in Zusammenhang mit der durch CMT3 katalysierten DNA-Methylierung, indem die Chromodomäne von CMT3 wiederum an dimethyliertes H3K9 bindet (Lindroth *et al.*, 2004).

Es wurde postuliert, dass die Polymerase V zusammen mit DDM1 und MET1 außerhalb von RdDM an spezifischen perizentromeren Repeats agieren kann (Pontes *et al.*, 2009). Reduktionen von DNA-Methylierungen und heterochromatischen Histon-Modifikationen am *LUC*-Transgen in der Pol V-Mutante *nrpd2a-h3* als auch in den Mutanten *met1-h1*, *ddm1-h1* und *cmt3-h1* lassen die Annahme zu, dass die Polymerase V auch am *LUC*-Locus zusammen mit MET1 und DDM1 in einem *Silencing*-Mechanismus agieren könnte und ebenfalls CMT3 von der Polymerase V-Funktion abhängig ist. Die Synthese von langen und nichtkodierenden Polymerase V-Transkripten scheint damit essentiell für das *Silencing* des *LUC*-Repeats zu sein, indem diese Transkripte Chromatin-*Remodeling*-Faktoren, DNA-Methyltransferasen und Histon-Methyltransferasen die Aufrechterhaltung von heterochromatischen Chromatinstrukturen ermöglichen.

***INCURVATA 2 (ICU2)*** kodiert für die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase  $\alpha$  und wurde bereits als ein Suppressor für TGS eines *35S-NPTII*-Gens im Mutantenhintergrund der DNA-Demethylase REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) identifiziert (Liu *et al.*, 2010). Eine Suppression von TGS in dieser *ICU2*-Mutante (*pol  $\alpha$* ) korrelierte am *35S-NPTII*-Gen, ebenso wie am *LUC*-Repeat in der Mutante *icu2-h1* (D 1121 N), mit einer Reduktion der H3K9-Dimethylierung, aber weitestgehend unveränderter DNA-Methylierung (Liu *et al.*, 2010). Zytologische Analysen zeigen allerdings keinen Einfluss der Punktmutante *icu2-h1* auf die Chromozentrenstruktur und auf die Verteilung von H3K9me2 in Chromozentren von Interphasekernen (A. Fischer, pers. Mitteilung). Zudem wurde eine Reaktivierung der heterochromatischen Elemente *TSI* (*TRANSCRIPTIONAL SILENT INFORMATION*) und *Ta3* in einer weiteren *missense*-Mutante *icu2-1* detektiert, was ebenfalls mit einer Reduktion von H3K9me2 an diesen Elementen korreliert (Hyun *et al.*, 2013). RT-PCR-Analysen an transponiblen Elementen könnten aufklären, ob in der am *LUC*-Repeat isolierten Suppressormutante *icu2-h1* ebenfalls perizentromere inaktive Elemente reaktiviert werden. Zudem wurde in der *missense*-Mutante *icu2-1* ein Defekt in der Aufrechterhaltung der heterochromatischen H3K27-Trimethylierung am *FLOWERING LOCUS C* während der Mitose beschrieben (Hyun *et al.*, 2013). An H3K27-trimethylierten Genen konnte dabei eine spezifische Assoziation von TERMINAL FLOWER 2 (LHP1/TFL2), dem orthologen Protein zu HETEROCHROMATIN 1 (HP1) aus Tieren und Hefe, nachgewiesen werden (Turck *et al.*, 2007). *In vitro*-Analysen ließen eine Interaktion der DNA-Polymerase  $\alpha$ / *INCURVATA 2* mit dem TERMINAL FLOWER 2 (LHP1/TFL2)-Protein vermuten (Barrero *et al.*, 2007). Weiterführende Interaktionsstudien weisen allerdings darauf hin, dass *ICU2* und LHP1/TFL2



nicht direkt *in vivo* interagieren, sondern dass eine Mutation von ICU2 zu einem Verlust der Bindung von LHP1 an Zielsequenzen führt (Hyun *et al.*, 2013). LHP1/TFL2 ist allerdings kein *Silencing*-Suppressor im *LUCIFERASE-Silencing*-System (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Zudem konnte in ersten Vorarbeiten am *LUC*-Locus in den Luc-Linien und in einigen untersuchten Suppressormutanten auch keine H3K27-Trimethylierung, im Vergleich zum *FLC*-Locus, detektiert werden (K. Irmeler, Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass H3K27me<sub>3</sub> nicht am heterochromatischen Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats beteiligt ist und dass ICU2 und LHP1 am *LUC*-Locus unabhängig voneinander agieren. Es ist möglich, dass ICU2 bei der Assemblierung von Chromatin eine Rolle spielt und eine stabile Aufrechterhaltung von repressiven Histonmodifizierungen, wie zum Beispiel H3K9me<sub>2</sub>, am *LUC*-Repeat während der Mitose gewährleistet (Hyun *et al.*, 2013).

Das ***HISTONDEACETYLASE 6***-Gen (*HDA6*) kodiert für eine RPD3-like-HISTONDEACETYLASE. *HDA6* ist in *Arabidopsis* als ein essentieller *Silencing*-Faktor beschrieben, der am transkriptionellem Gen-*Silencing* von transponiblen Elementen und ribosomalen RNA-Repeats beteiligt ist (Murfett *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012b). Die Punktmutante *hda6-h1* (G 171 R) zeigt, wie die *NRPD2a*- und *ICU2*-Mutanten, ebenfalls nur eine Reduktion von H3K9me<sub>2</sub>, aber nicht von H3K27me<sub>1</sub>, am *LUC*-Repeat (Abb. 3.12 und Abb. 3.13).

*HDA6* entfernt Acetylgruppen an verschiedenen Lysinen von Histonen (Earley *et al.*, 2006; Earley *et al.*, 2010). In der Mutante *hda6-h1* wurden erhöhte euchromatische H3K9-Acetylierungen am *LUC*-Repeat im Vergleich zur Luc-Linie detektiert (Abb. 3.13). Dies lässt vermuten, dass *HDA6* durch Deacetylierungen von H3K9 am Gen-*Silencing* des *LUC*-Locus beteiligt ist. Das Lysin 9 kann allerdings nicht durch Acetylierung und Methylierung gleichzeitig modifiziert werden, weswegen eine H3K9-Methylierung die Deacetylierung von H3K9 voraussetzt (Park *et al.*, 2011; Stewart und Li 2005). H3K9-Acetylierungen haben somit auch reduzierte H3K9-Dimethylierungen am *LUC*-Repeat zur Folge (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Die Deacetylierungsfunktion von *HDA6* scheint somit eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende H3K9-Methylierung und für heterochromatisches Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats zu sein.

Die bereits in anderen *Silencing*-Systemen identifizierten *HDA6*-Mutantenallele *axe1-5* oder *sill1* (*modifiers of silencing 1*) sind ebenfalls durch Reaktivierung von transkriptionell inaktivierten und methylierten repetitiven Transgenen und endogenen Repeats gekennzeichnet

(Furner *et al.*, 1998; Murfett *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2012b). In den Mutanten *axe1-5* und *sill* konnten Hypermethylierungen von H3K4me1, H3K4me2 und H3K36me2 sowie H3- und H4-Hyperacetylierungen an rDNA-Repeats und transponiblen Elementen detektiert werden (Probst *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012b). Auch am *LUC*-Repeat scheint H3K9-Hyperacetylierung mit einer Erhöhung der H3K4-Dimethylierung zu korrelieren. Allerdings war die Methylierung von H3K4me2 in der Mutante *hda6-h1* nicht signifikant (Abb. 3.12). Weitere CHIP-Analysen sind in der Mutante *hda6-h1* notwendig, um einen signifikanten Anstieg von H3K4me2 und weiteren euchromatischen Histonmodifizierungen, wie z.B. H3K4me1 und H3K4me3 oder auch H3K36-Methylierung und H4-Acetylierung, am *LUC*-Repeat zu belegen. Die Akkumulation von euchromatischen Histon-Modifizierungen am *LUC*-Locus in der Mutante *hda6-h1* würde vermuten lassen, dass HDA6 für die Etablierung von inaktiven Histonmodifizierungen am *LUC*-Transgen eine primäre Rolle spielt.

HDA6 ist außerdem an der strukturellen Organisation von repetitiver DNA beteiligt. Veränderungen in der Organisationsstruktur von rDNA-Repeats in der *HDA6*-Mutante *axe1-5* (Probst *et al.*, 2004) konnten ebenfalls in FISH-Analysen in der Mutante *hda6-h1* beobachtet werden (Irmeler 2006). Des Weiteren waren die rRNA-Repeats in den Mutanten *axe1-5* und *sill* durch DNA-Hypomethylierungen gekennzeichnet (Probst *et al.*, 2004). Die DNA-Methylierung am *LUC*-Locus ist in der Mutante *hda6-h1* nur an den symmetrischen CpNpG-Motiven reduziert (A. Fischer, pers. Mitteilung). Genomweite Analysen belegen, dass die Mutation von *HDA6* zu DNA-Hypomethylierungen an den drei Sequenzmotiven CpG, CpNpG und CpN sowohl in Promotoren von Genen (Stroud *et al.*, 2013) als auch an verschiedenen Transposons führt (Liu *et al.*, 2012b). Deshalb sollte in weiteren Analysen auch der 35S-Promotor des *LUC*-Repeats im *hda6*-Hintergrund auf veränderte DNA-Methylierungen in allen drei Sequenzmotiven überprüft werden. Es wäre auch möglich, dass die unveränderte DNA-Methylierung in CpG- und CpNpN-Motiven im *LUC*-Gen auf eine Restaktivität von HDA6 in der Punktmutante *hda6-h1* zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die CpNpG-Methylierung durch CMT3 reguliert wird und abhängig von H3K9me2 ist (Johnson *et al.*, 2002a; Lindroth *et al.*, 2004). Die reduzierte CpNpG-Methylierung am *LUC*-Locus korreliert ebenfalls mit reduzierter Methylierung von H3K9me2 in der Mutante *hda6-h1*. Dies lässt vermuten, dass HDA6 durch Regulierung von H3K9me2 auch an der Aufrechterhaltung der CpNpG-Methylierung am *LUC*-Repeat beteiligt ist. *In vivo*- und *in vitro*-Analysen deuten zudem darauf hin, dass HDA6 zudem direkt mit der Methyltransferase MET1 interagieren kann und somit auch CpG-Methylierungen reguliert (Liu *et al.*, 2012b).

Die Funktion von HDA6 scheint somit am *LUC*-Repeat eine essentielle Rolle für transkriptionelles Gen-*Silencing* zu spielen, in dem Deacetylierungen von H3K9 sowie Methylierungen von H3K4 reguliert und damit die Etablierung von heterochromatischer H3K9-Dimethylierung und DNA-Methylierung ermöglicht wird.

***RNR1 (RIBONUKLEOTIDREDUKTASE 1)*** kodiert für die große regulatorische Untereinheit der heterodimeren RIBONUKLEOTIDREDUKTASE (RNR) (Sauge-Merle *et al.*, 1999, Laman *et al.*, 1995). Ribonukleotidreduktasen katalysieren die Reduktion von Ribonukleotid-Diphosphaten (NDPs) zu Desoxyribonukleotid-Diphosphaten (dNDPs) und sind damit essentielle Enzyme in der Synthese von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) für die DNA-Replikation, DNA-Reparatur sowie für die DNA- und RNA-Synthese (Jordan und Reichard, 1998; Sauge-Merle *et al.*, 1999).

*Southern-Blot*- und Bisulfit-Analysen belegen eine unveränderte DNA-Methylierung am *LUC*-Transgen in der *RNR1*-Mutante *rnr1-h1* (A 763 T) (Fiedler 2007; Körner 2011). Die H3K27-Monomethylierung ist im Vergleich dazu in *rnr1-h1* am *LUC*-Repeat reduziert, wobei die Methylierung von H3K9me2 unverändert ist (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). RNR1 ist damit ein bisher unbekannter *Silencing*-Faktor in *Arabidopsis*, der TGS des *LUC*-Repeats unabhängig von der DNA-Methylierung reguliert (Fiedler 2007). Nur für die kleine Untereinheit RNR2 der RIBONUKLEOTIDREDUKTASE wurde bereits eine *Silencing*-Suppression beschrieben und die Reaktivierung des perizentromen Repeats TSI (*TRANSCRIPTIONAL SILENT INFORMATION*) in *Arabidopsis* nachgewiesen (Wang und Liu 2006).

Erstmals mit Gen-*Silencing* in Zusammenhang gebracht wurde RNR1 in *Saccharomyces cerevisiae*, indem eine Involvierung von RNR1 am *Silencing* von *mating-type*-Genen und Telomeren (Telomer-Positionseffekte) beschrieben wurde (Laman *et al.*, 1995; Sussel *et al.*, 1995). Desweiteren konnten in *RNR1*-Mutanten in der Hefe reduzierte dNTP-Level sowie Zellzyklus-Störungen nachgewiesen werden (Kumar *et al.*, 2010). Auch in der *RNR1*-Mutante *cls8-1* wurden signifikante Reduktionen von dTTP- und dATP-Level in *Arabidopsis* nachgewiesen (Garton *et al.*, 2007). Es wäre möglich, dass die Zugabe von dNTPs den TGS-Suppressorphänotyp der Mutante *rnr1-h1* am *LUC*-Repeat kompensiert. Damit könnte überprüft werden, ob RNR1 allein über den dNTP-Level transkriptionelles Gen-*Silencing* reguliert. Es wurde spekuliert, dass reduzierte dNTP-Level zu Störungen der DNA-Replikation und DNA-Reparatur führen und eine Suppression von TGS zur Folge haben

könnte (Wang und Liu 2006). Die Funktion von RNR wäre damit essentiell für die Zellerblichkeit von epigenetischen Zuständen.

Analysen zur spezifischen Verteilung in Interphasekernen von *Arabidopsis* wiesen die Fusionsproteine *c-myc*-RNR1 sowie *GFP*-RNR1 sowohl im Euchromatin als auch an Chromozentren nach (Körner 2011). Dekondensierte Chromozentren sowie ektopische Umverteilungen der zentromeren 180 bp-Repeats in Interphasekernen der Mutante *rnr1-h1* (Körner 2011) belegen eine Funktion von RNR1 an der Aufrechterhaltung und Regulation von heterochromatischen Chromatinstrukturen.

Die reduzierte Methylierung von H3K27me1 am *LUC*-Transgen in der *RNR1*-Mutante lässt zudem auf eine Funktion von RNR1 an der Etablierung dieser heterochromatischen Histonmodifizierung schließen. In *Arabidopsis* konnte für die Histon-Methyltransferasen ATXR5 und ATXR6 *in vivo* eine H3K27-Monomethyltransferaseaktivität sowie eine Rolle bei der Chromatinkondensation und Gen-*Silencing* nachgewiesen werden (Jacob *et al.*, 2009). Analysen in einer *atr5/atr6*-Doppelmutante belegen, dass die reduzierte H3K27-Monomethylierung keinen Einfluss auf H3K9-Dimethylierung und DNA-Methylierung hat (Jacob *et al.*, 2009). DNA-Methylierung und H3K9-Dimethylierung finden somit unabhängig von H3K27-Dimethylierung statt, jedoch setzt Gen-*Silencing* sowohl H3K27-Monomethylierung als auch DNA-Methylierung und H3K9-Dimethylierung auch am *LUC*-Repeat voraus. Es wurde somit vermutet, dass H3K27-Monomethylierung und DNA-Methylierung/H3K9me2 zwei essentielle und unabhängige Reaktionswege betreffen könnten, welche beide für heterochromatisches Gen-*Silencing* in *Arabidopsis* notwendig sind (Jacob *et al.*, 2009). Die Analyse der H3K27-Monomethylierung an den reaktivierten transponiblen Elementen *CACTA*, *MULE* und *ATHILA6* in der Mutante *rnr1-h1* könnten weitere Erkenntnisse liefern, ob RNR1 zusammen mit H3K27-Monomethyltransferasen locusspezifisch agieren kann. Weitere Erkenntnisse zur Funktion von RNR1 könnten auch durch die Assoziation des RNR1-Fusionsproteins am *LUC*-Repeat im Hintergrund verschiedener *Silencing*-Suppressormutanten gewonnen werden.

Besonders interessant ist eine weitere Gruppe mit den drei *Silencing*-Mutanten *ttg2-h1*, *atr1-h1* und *bru1-2*, die durch unveränderte Methylierungen von H3K9me2 und H3K27me1 am *LUC*-Repeat gekennzeichnet sind (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Neben *rnr1-h1* und *mom1* (*maintenance of methylation 1*) stellen sie außerdem weitere *Silencing*-Suppressormutanten dar, bei denen keine Veränderungen der DNA-Methylierung beobachtet wurden (Hofmann 2004; Meinel 2007; Hanowski 2011; Vaillant *et al.*, 2006; Mittelsten Scheid *et al.*, 2002).

Diese drei Faktoren kontrollieren somit *Silencing* unabhängig von DNA-Methylierung, H3K9-Dimethylierung und H3K27-Monomethylierung. Alle drei Suppressormutanten zeigen allerdings Veränderungen in der Dekondensation von Chromozentren (Hanowski 2011; Meinel 2007; A. Fischer, pers. Mitteilung). BRU1, TTG2 und ATRX1 scheinen somit notwendig für die Organisation von perizentrischem Heterochromatin zu sein.

Das Gen *TTG2* kodiert für den WRKY-Transkriptionsfaktor **TRANSPARENTA TESTA GLABRA 2 (TTG2)**. Bisher ist eine Rolle von TTG2 bei Entwicklungsprozessen von Trichomen beschrieben (Johnson *et al.*, 2002b). Verschiedene  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-*Assays* belegen für TTG2 eine gewebespezifische Expression in sich entwickelnden Samenhüllen, in Wurzelspitzen (Johnson *et al.*, 2002b), in Trichomen, in den Randmeristemen von jungen Blättern (Johnson *et al.*, 2002b; Hanowski 2011) und in der Blatthauptvene (Hanowski 2011). Im *LUC-Silencing*-System konnte zudem für *ttg2* ein *Silencing*-Suppressor-Effekt nachgewiesen werden. Die Mutante *ttg2-h1* (W 122 #) zeigt im Vergleich zu den anderen Suppressormutanten eine gewebespezifische Reaktivierung der *LUCIFERASE*-Expression (Hofmann 2004), die mit der gewebsspezifischen Expression des *TTG2*-Gens korreliert (Johnson *et al.*, 2002b; Hanowski 2011). Lokalisationsanalysen in Interphasekernen belegen für *myc*-TTG2 eine Assoziation im Euchromatin und im Heterochromatin (A. Fischer, pers. Mitteilung).

In der Mutante *ttg2-h1* konnten in einer genomweiten Expressionsanalyse über 2184 deregulierte Gene gefunden werden, unter denen sich neben den zwei DNA-Demethylasen ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) und DML3 (DEMETER LIKE PROTEIN 3) auch zwei Gene für die putativen Histondeacetylasen HD2A und HDA18 befanden (Hanowski 2011). DML3 besitzt nicht nur die Fähigkeit zur Demethylierung von DNA, sondern ist wahrscheinlich auch an der Aufrechterhaltung methylierter DNA-Bereiche beteiligt (Ortega-Galisteo *et al.*, 2008). Eine *HD2A*-T-DNA-Mutante zeigte wie die Mutante *ttg2-h1* einen *Silencing*-Suppressoreffekt des *LUC*-Transgens, der mit einer signifikanten Reduktion der asymmetrischen CpNpN-Methylierung im *LUC*-Repeat korrelierte (Hanowski 2011). Im Gegensatz dazu konnte für eine *HDA18*-T-DNA-Mutante kein *Silencing*-Suppressoreffekt des *LUC*-Transgens nachgewiesen werden (Hanowski 2011). Es ist anzunehmen, dass TTG2 die Expression der beiden Histondeacetylasen HD2A und HDA18 reguliert, welche wiederum an der Deacetylierung von Histonen am *LUC*-Transgen beteiligt sind. Allerdings wurde in ChIP-Analysen am *LUC*-Locus der *TTG2*-Mutante keine erhöhte H3K9-Acetylierung, sondern eine signifikante Reduktion detektiert (Abb. 3.13). Dies lässt vermuten, dass HD2A und HDA18 nicht an der Deacetylierung von H3K9 am *LUC*-Locus beteiligt sind. Womöglich katalysieren

sie die Deacetylierung von anderen Lysinresten der Histone oder ihre Wirkung ist sequenzspezifisch. Über die Funktionen von HD2A und HDA18 in Bezug auf Histonmodifikationen ist bisher nichts bekannt. ChIP-Analysen in einer *HD2A*-Mutante könnten die Funktion von HD2A am *LUC*-Repeat aufklären. Es wäre auch interessant zu überprüfen, ob eine *HD2A/HDA6*-Doppelmutante zu einer dramatischen Veränderung von DNA- und Histonmodifizierungen führt. Das Fehlen eines WRKY-spezifischen W-Box-Bindemotives in den Promotoren der beiden HDA-Gene lässt zudem vermuten, dass TTG2 die Expression dieser Gene nur indirekt kontrolliert.

Vermutlich ist TTG2 sowohl indirekt als auch direkt an der Transkriptionsinitiation einiger Chromatinfaktoren beteiligt, welche im *Silencing*-Prozess des *LUC*-Repeats eine Rolle spielen könnten. Die Analyse von weiteren durch TTG2 regulierte Gene und deren Effekte im *LUC*-System könnte neue *Silencing*-Suppressoren identifizieren und die Rolle von TTG2 als *Silencing*-Suppressor aufklären.

Mit **ATRX1** wurde ein Protein im *LUC*-System isoliert, welches signifikante Homologien zu den zwei bereits bekannten SWI/SNF-*Remodeling*-Proteinen DDM1 und DRD1 in *Arabidopsis* zeigt (Meinel 2007) und zur Superfamilie der DEXD/H-ATPasen gehört (Eisen *et al.*, 2005). ATRX1 weist die für die SWI/SNF-Proteinfamilie charakteristischen Domänen DEXDc (*DEAD-like helicases superfamily*), HELICc (*helicase superfamily c-terminal domain*) und SNF2\_N (*SNF2 family N-terminal domain*) auf (www.ncbi.nlm.nih.gov; Meinel 2007; Eisen *et al.*, 2005; Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Die Punktmutation (T 1257 I) in *atr1-h1* ist dabei in der hoch konservierten HELICc-Domäne lokalisiert (Meinel 2007). SNF2\_N und HELICc bilden die katalytische SWI/SNF-ATPase-Domäne und sind essentiell für die Chromatin-*Remodeling*-Funktion (Lusser und Kadonaga 2003).

ATRX1 ist homolog zum humanen ATRX, dessen Mutation im Menschen zum *X-linked  $\alpha$ -Thalassemia/Mental Retardation*-Syndrom führt (Gibbons *et al.*, 1995; Meinel 2007). Humanes ATRX ist mit perizentrischem Heterochromatin assoziiert (McDowell *et al.*, 1999) und bindet präferentiell an repetitive DNA-Sequenzen und Tandem-Repeats (Law *et al.*, 2010b). Das mit einem *myc*-Tag fusionierte ATRX1 konnte in *Arabidopsis* sowohl im Heterochromatin als auch im Euchromatin von Interphasekernen lokalisiert werden (Strödecke 2010). DNaseI-*Protection-Assays* belegen zudem in *atr1-h1* eine erhöhte Zugänglichkeit der DNA am *LUC*-Transgen, der in einer erhöhten Sensitivität der DNA gegenüber DNaseI resultiert (Strödecke 2012). Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass ATRX1 durch eine putative Chromatin-*Remodeling*-Funktion am Gen-*Silencing* des

*LUCIFERASE*-Repeats beteiligt sein könnte (Strödecke 2012). Unveränderte DNA- und Histonmethylierungen am *LUC*-Locus in *atr1-h1* lassen zudem vermuten, dass diese epigenetischen Modifizierungen alleine keinen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben.

In der Mutante *atr1-h1* konnten neben der Reaktivierung des *MULE*-Transposons (Abb. 3.18) in einer genomweiten Expressionsanalyse von 37218 Genen 1019 Gene als signifikant dereguliert identifiziert werden (V. Krauss, pers. Mitteilung). Der putative Chromatin-Remodeling-Faktor ATRX scheint somit eine generelle Funktion in der Aufrechterhaltung einer kompakten heterochromatischen Chromatinstruktur zu haben.

Verschiedene SALK-Mutanten für *ATRX1* weisen zudem einen deutlichen Spätblühphänotyp in *Arabidopsis* auf, der mit einer Reduktion der H3K27-Trimethylierung am *FLOWERING LOCUS C (FLC)* korreliert (S. Meinel, pers. Mitteilung). Vernalisation-induziertes *Silencing* von *FLC* wird über H3K27me3-Methylierung durch den PHD-Polycomb Repressive Komplex 2 (PHD-PRC2) reguliert (Gendall *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2006). Die Komplexkomponente EZA1/SWINGER von PHD-PRC2 (Wood *et al.*, 2006) konnte *in vivo* als putativer Interaktor für ATRX identifiziert werden (Strödecke 2012). ChIP-Ergebnisse belegen allerdings eine Abwesenheit von H3K27me3 am *LUC*-Repeat im Vergleich zum *FLC* (K. Irmeler, Daten nicht gezeigt) und lassen damit Polycomb-*Silencing* am *LUC*-Repeat ausschließen. Diese Ergebnisse könnten eine Chromatin-Remodeling-Funktion von ATRX1 und eine putative Interaktion mit EZA1/SWINGER an entwicklungspezifischen Genen vermuten lassen (Strödecke 2012).

Es wird zudem spekuliert, dass humanes ATRX und die Histonvariante H3.3 die Grenzen von transkriptionell aktivem und inaktivem Chromatin im Menschen definieren (Goldberg *et al.*, 2010). Im Menschen interagiert das Histone-Chaperon DAXX mit ATRX und beide Proteine sind an der Integration der Histonvariante H3.3 in Nukleosome an Telomerrepeats des Menschen involviert (Lewis *et al.*, 2010; Goldberg *et al.*, 2010). Obwohl H3.3 normalerweise in transkriptionell aktivem Chromatin gefunden wird, ist die Anwesenheit von H3.3 an ATRX-Zielsequenzen notwendig für die transkriptionelle Repression der humanen Telomerrepeats (Goldberg *et al.*, 2010). Zudem ist die Anwesenheit der Heterochromatin-Proteine HP1 $\alpha$  und HP1 $\beta$  an Telomersequenzen von einer Assoziation mit ATRX abhängig (Berube *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2010). Es wäre möglich, dass auch ATRX1 in *Arabidopsis* an der Integration von Histonvarianten an Repeatstrukturen beteiligt ist und darüber eine Funktion im transkriptionelles Gen-*Silencing* ausübt. Weitere Analysen mit dem in dieser Arbeit hergestellten V5/His-Histonfusionsproteinen könnten zur Aufklärung der Funktion von ATRX1 am Gen-*Silencing* beitragen.

Das **BRUSHY1-Protein (BRU1)** zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen mit bekannter Funktion in *Arabidopsis*, Tieren oder Pilze. Es enthält zwei konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die als N-terminale Tetratricopeptid-*Repeats* (TPRs) und als C-terminale leucinreiche *Repeats* (LRRs) vorliegen, sowie ein vorhergesagtes Leucin-Zipper-Motiv und ein Kernlokalisierungssignal (Kobe und Deisenhofer 1994; Blatch und Lässle 1999; Takeda *et al.*, 2004). Das erste *BRU*-Mutantenallel *bru1-1* wurde bei der Isolation von Mutanten mit erhöhter Sensitivität gegenüber dem DNA-schädigenden Stoff MMS (Methylmethansulfonat) isoliert und damit eine Rolle von BRU1 bei Rekombinations- und Reparaturprozessen postuliert (Takeda *et al.*, 2004). Die Mutante *bru1-1* (31 bp-Deletion führt zu einer verkürzten LRR-Domäne) wurde als eine schwache TGS-Suppressormutante beschrieben, die nicht mit Veränderungen der DNA-Methylierung verbunden ist (Takeda *et al.*, 2004). Ebenso zeigt das im *LUC-Silencing*-System isolierte Mutantenallel *bru1-2* (G 214 R, in der TPR-Region) in *Southern-Blot*- und Bisulfit-Analysen keine Veränderungen der DNA-Methylierung (Hofmann 2004; A. Fischer, pers. Mitteilung) als auch in ChIP-Analysen unveränderte Histonmodifizierungen von H3K9me2 und H3K27me1 am *LUC*-Locus (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Die *Silencing*-Suppression des *LUC*-Transgens in der *BRU1*-Mutante korreliert allerdings mit einem signifikanten Anstieg der euchromatischen Modifizierungen H3K4me2 und H3K9ac am *35S*-Promotor (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). BRUSHY 1 wurde als einer der ersten Chromatinfaktoren beschrieben, der an der Replikation und Stabilisierung von Chromatinstrukturen beteiligt ist und damit eine Verbindung von Chromatin-Replikation, epigenetischer Vererbung, DNA-Reparatur und der Regulation von Meristementwicklung aufzeigt (Takeda *et al.*, 2004). Neben BRU1 wurden mit MMS19, ICU2 (INCURVATA 2), AE7 (ASYMMETRIC LEAVES 1/2 ENHANCER 7) (Gerschke 2011) und der Serin/Threonin-Proteinkinase TSL (TOUSLED) (Heider 2011) weitere *Silencing*-Faktoren für TGS des *LUC*-Repeats identifiziert, denen bisher eine Rolle bei der DNA-Reparatur und Replikationsprozessen zugeschrieben wurde und die darüber wahrscheinlich die Etablierung bzw. mitotische Stabilität von Chromatineigenschaften nach der Replikation kontrollieren.



#### 4.4 Das Zusammenspiel von RNA-Transkripten und DNA- und Histon-Methylierung am *LUC*-Transgen

Heterochromatisches Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats beinhaltet zusammenfassend mehrere wichtige molekulare Prozesse. Zum einen werden Pol V-abhängige *antisense*- und *sense*-Transkripte vom *LUC*-Repeat synthetisiert. Nukleosomen-*Remodeling*-Proteine regulieren die Zugänglichkeit des Chromatins und ermöglichen die Bindung von DNA- und Histon-bindenden Proteinen. Durch Histon-Deacetylasen werden euchromatische Histonmodifizierungen entfernt und damit die Etablierung von aktivem Chromatin verhindert. Es finden bisher unbekannte epigenetische Prozesse statt, die essentiell für die finale Definierung von Gen-*Silencing* sind. Die Analyse der verschiedenen *Silencing*-Suppressormutanten lassen einen putativen molekularen Mechanismus für TGS am *LUC*-Repeat ableiten.

Durch die Polymerase V werden am *LUC*-Repeat *sense*- und *antisense*-Transkripte synthetisiert. Vermutlich beeinflusst AE7 die Transkription der Polymerase V am *LUC*-Repeat. Es ist anzunehmen, dass die Pol V-Transkription die Bindung der Polymerase II und damit eine mRNA-Synthese am *LUC*-Repeat verhindert. Die Pol V-Transkripte rekrutieren wahrscheinlich nachfolgend DNA- und Histon-modifizierende Chromatinfaktoren und Komplexe. Die SWI/SNF-Nukleosomen-*Remodeling*-Faktoren DDM1 und DRD1 regulieren hierbei vermutlich die Zugänglichkeit des Chromatins am *LUC*-Locus und ermöglichen damit die Bindung von DNA- und Histon-bindenden Proteinen. Durch die METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) wird die *maintenance*-CpG-Methylierung am *LUC*-Locus katalysiert und dadurch wahrscheinlich die Bindung von SRA-Methyltransferasen und nachfolgender Dimethylierung von H3K9 ermöglicht (Johnson *et al.*, 2007). Eine Dimethylierung von H3K9 setzt wiederum die Deacetylierung von H3K9, unter anderem durch HDA6, voraus. Vorausgehende Analysen ließen bereits vermuten, dass MET1, DDM1 (Pontes *et al.*, 2009) und HDA6 (Lippman *et al.*, 2003) zusammen in einem Proteinkomplex agieren. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Histondeacetylasen, wie HDA2 und vermutlich auch Histon-Demethylasen, die Etablierung von euchromatischen Modifizierungen am *LUC*-Repeat verhindern. Für die Histon-Methyltransferasen SUVH2, KYP/SUVH4, SUVH6 und SUVH9 wurde über die SRA-Domänen (SET- und RING-assoziierte Domäne) eine direkte Bindung an methylierte CpG-Motive nachgewiesen (Johnson *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008). Studien belegen, dass durch diese DNA-Bindung von SUVH2 und SUVH9 die Polymerase V an bereits CpG-methyliertes Chromatin rekrutiert wird (Johnson *et al.*, 2014).

Durch die SUVH-Histon-Methyltransferasen etablierte H3K9- und H3K27-Methylierungen sind wiederum eine Voraussetzung für die CpNpG-Methylierung durch CMT3, indem CMT3 über die Chromodomäne direkt mit dem N-terminalen Abschnitt des Histon 3 interagiert, wenn die Lysine 9 (H3K9) und 27 (H3K27) gleichzeitig methyliert sind (Jackson *et al.*, 2002; Lindroth *et al.*, 2004). DNA-Methylierungen und Histon-Methylierungen sind damit über komplexe Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden. Die Analysen in den verschiedenen Suppressormutanten machen deutlich, dass eine Reaktivierung von TGS am *LUC*-Repeat nicht eine Demethylierung von DNA sowie von H3K9 und H3K27 voraussetzt. Jedoch setzt Gen-*Silencing* sowohl H3K27-Monomethylierung als auch DNA-Methylierung und H3K9-Dimethylierung am *LUC*-Repeat voraus. Es finden vermutlich finale Prozesse statt, in welchen u.a. die Faktoren ATRX1, BRU1, ICU2 und TTG2 involviert sind. Es ist anzunehmen, dass diese Faktoren vererbare Chromatineigenschaften definieren und Genexpression, DNA-Reparatur und die Genomstabilität regulieren. Genomweite Analysen belegen neben dem *LUC*-Repeat insgesamt 115 weitere Gene, die durch DDM1, DRD1, RNR1, ATRX1 und TTG2 gemeinsam reguliert werden (V. Krauss, pers. Mitteilung).

Mit Ausnahme der *Luc8* konnten nur sehr geringe Mengen an siRNAs am *LUC*-Repeat in den transkriptionell inaktiven *Luc*-Linien *Luc6*, *Luc7*, *Luc9* und *Luc12* nachgewiesen werden, was siRNA-unabhängiges Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat vermuten lässt. Die Analysen zum Pol V-abhängigen heterochromatischen Gen-*Silencing* des *LUC*-Repeats zeigen zudem auf, dass in Pflanzen kein allgemeiner *Silencing*-Mechanismus existiert. Vorhergehende Studien belegen, dass die Polymerase V auch unabhängig von RdDM agieren kann (Pontes *et al.*, 2009). Zudem wurden auch von der DNA-Methylierung unabhängige *Silencing*-Mechanismen in *Arabidopsis* beschrieben, an denen beispielsweise MOM1 (MAINTENANCE OF METHYLATION 1) (Vaillant *et al.*, 2006; Mittelsten Scheid *et al.*, 2002) involviert ist. Verschiedene Loci werden somit durch unterschiedliche und möglicherweise auch überlappende *Silencing*-Mechanismen inaktiviert und reguliert. Die Vielzahl dieser *Silencing*-Mechanismen in Pflanzen spiegelt die Wichtigkeit der Genregulation während der Entwicklung und Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität wieder.

#### 4.5 Reaktivierung von mobilen Elementen in *Silencing*-Suppressormutanten

Genomweite Analysen zeigten auf, dass große Teile der eukaryotischen Genome aus Transposons bestehen. Während die Transposonsequenzen in *Arabidopsis* ca. 10 % des Genoms ausmachen, werden ca. 85 % des Maisgenom von diesen mobilen Elementen abgedeckt (*Arabidopsis* Genom Initiative 2000; Schnable *et al.*, 2009). Transposons

beeinflussen die Genomstabilität, indem sie beispielsweise Mutationen in funktionellen Genen verursachen. Deswegen haben Eukaryoten epigenetische Mechanismen zur Inaktivierung dieser mobilen Elemente entwickelt. Genomweite Analysen belegen hypermethylierte DNA in Transposons (Zemach *et al.*, 2010). Allgemein werden die mobilen Elemente in die zwei Klassen der Retrotransposons (Klasse I) und DNA-Transposons (Klasse II) unterteilt (Feschotte *et al.*, 2002). Diese mobilen Elemente sind vor allem in den perizentromeren Regionen lokalisiert (*Arabidopsis Genome Initiative* 2000; Johnson *et al.*, 2007).

Zytologische H3K9me2-Färbungen und FISH-Analysen mit einer Sonde für das zentromere 180 bp-Repeat belegen signifikante Dekondensationen bis hin zu einem Verlust von definierten Chromozentrumstrukturen in den *Silencing*-Suppressormutanten des *LUC*-Repeats (A. Fischer, pers. Mitteilung). Die veränderte Chromozentrummorphologie in Suppressormutanten korreliert auch mit einer *Silencing*-Suppression von mobilen Elementen (Abb. 3.18). Transkriptionelles Gen-*Silencing* der Retrotransposons *AtSNI* (*A. thaliana SINE like element 1*) (Myouga *et al.*, 2001) wird durch die Synthese von 24 nt-siRNAs durch die Pol IV und langen nichtkodierenden Pol V-Transkripten vermittelt (Wierzbicki *et al.*, 2008). Diese *AtSNI*-Elemente sind bekannte Zielsequenzen für 24 nt-siRNA-abhängige DNA-Methylierung (RdDM) (Zilberman *et al.*, 2003; Wierzbicki *et al.*, 2008; Kuhlmann *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in den *LUC-Silencing*-Suppressormutanten für die Pol V-Untereinheiten NRPE1 und NRPE2a dementsprechend reaktivierte *AtSNI*-Elemente detektiert. *AtSNI*-Transkripte in den Mutanten *ddm1-h1* und *drd1-h1* deuten ebenfalls auf eine Funktion von DDM1 und DRD1 am *Silencing* von *AtSNI* hin (Abb. 3.18). Ein transkriptionell inaktives *AtSNI* in allen anderen bisher untersuchten *LUC-Silencing*-Suppressormutanten untermauert die Vermutung, dass diese Faktoren in einen 24 nt-siRNA-unabhängigen *Silencing*-Mechanismus involviert sind und dementsprechend siRNAs beim *Silencing* des *LUC*-Transgens eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine Studie belegt über 2000 reaktivierte Transposons in einer *DDM1*-Mutante, wo hingegen nur ca. 40 Transposons in RdDM-Mutanten gefunden wurden (Zemach *et al.*, 2013). Deswegen wurde spekuliert, dass RdDM nur eine geringe Rolle bei der DNA-Methylierung von Transposons im Vergleich zum DDM1-Reaktionsweg besitzt (Zemach *et al.*, 2013; Matzke und Mosher 2014).

Am *Silencing* von *CACTA*-like Transposons ist Chromatin-*Remodeling* durch DDM1 beteiligt (Abb. 3.18), was mit vorrausgehenden Analyseergebnissen korreliert (Mathieu *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2003). Darüber hinaus vermitteln auch CMT3 und DRD1 die DNA-Methylierung

und das Chromatin-Remodeling an *CACTA*-Elementen (Abb. 3.18). Die Transkription des Retroelements *ATHILA* wurde in den Mutanten *ddm1-h1*, *cmt3-h1* und *drd1-h1*, als auch in anderen Mutanten für *DDM1* (Hirochika *et al.*, 2000), *CMT3* (Lindroth *et al.*, 2001) und *DRD1* detektiert. Die Reaktivierung von *ATHILA6* in den Suppressor-Mutanten *ae7-h1* und *rnr1-h1* deutet auf eine Funktion von AE7 und RNR1 am *Silencing* von *ATHILA6* hin. Bisherige Untersuchungen belegen einen Pol V- und RdDM-unabhängigen *Silencing*-Mechanismus an *ATHILA*-Elementen (Pontes *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wird *Silencing* von den DNA-Transposons *Mutator-like Elements (MULEs)* von einer Vielzahl von Chromatinfaktoren kontrolliert. Neben den bekannten Faktoren für DNA-Methylierung (*CMT3*), Chromatin-Remodeling (*DDM1*, *DRD1*) und der Polymerase V, die *Silencing* von *MULE*-Transposons kontrollieren (Abb. 3.18; Singer *et al.*, 2001), scheinen auch *TSL*, *AE7*, *MMS19*, *RNR1* und *ATRX1* in den *Silencing*-Mechanismus von *MULE* involviert zu sein (Abb. 3.18). *TSL* kodiert für die Serin/Threonin-Kinase *TOUSLED* (Roe *et al.*, 1997). Neben einer *Silencing*-Suppression von *MULE* (Abb. 3.18) und des inaktiven *LUC*-Repeats in der Mutante *tsl1-h1* (Heider 2011), wurde bereits die Reaktivierung eines transkriptionell inaktiven *35S-NPTII*-Transgens im Mutantenhintergrund der DNA-Demethylase *REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1)* sowie des endogenen und transkriptionell inaktiven Locus *TSI* in einer weiteren *TSL*-Mutante beschrieben (Wang *et al.*, 2007).

Unterschiedliche Reaktivierungen der Transposons in den verschiedenen Suppressormutanten zeigen auf, dass nicht alle Transposons in *Arabidopsis* einem allgemeinen *Silencing*-Mechanismus unterliegen. Die Vielfalt dieser Mechanismen in Pflanzen, die sich an einigen Loci wahrscheinlich auch überlappen, stellt sicher, dass die mobilen Elemente inaktiviert vorliegen. In zukünftigen Experimenten sollten noch weitere isolierte *LUC-Silencing*-Suppressormutanten auf Transposonreaktivierung überprüft werden, um weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel der am *LUC*-Repeat isolierten Chromatinfaktoren an spezifischen Loci zu erhalten. Die Expressionsergebnisse lassen außerdem vermuten, dass die am *LUC*-Transgen identifizierten *Silencing*-Faktoren auch *Silencing* von spezifischen perizentromeren Transposonklassen kontrollieren und dabei wahrscheinlich unabhängig von 24 nt-siRNA-Biogenese und siRNA-abhängiger DNA-Methylierung (RdDM) agieren. Der Einfluss von *Silencing*-Suppressormutanten auf die Kondensation von Heterochromatin in Chromozentren und auf endogene und transkriptionell inaktivierte transponible Elemente zeigt zudem auf, dass die identifizierten Faktoren eine generelle Funktion in der Aufrechterhaltung von heterochromatischen Strukturen und im transkriptionellen Gen-*Silencing* haben.

#### 4.6 Spezifische eu- und heterochromatische Assoziation von V5/His-Histon-Fusionsproteinen

Die erfolgreiche Expression und die Integration der verschiedenen Fusionshistone in das Chromatin wurden mit einem V5-spezifischen Antikörper in immunozytologischen Färbungen und in ChIP-Analysen nachgewiesen. Die bereits in immunozytologischen Färbungen beobachtete spezifische Lokalisation der Histonvariante H3.1-V5/His in den heterochromatischen Chromozentren (Gläser 2010) konnte in dieser Arbeit bestätigt und mittels Chromatin-Immunopräzipitation eine präferentielle Assoziation an verschiedenen heterochromatischen und transkriptionell inaktiven Genen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu ist H3.3-V5/His präferentiell mit dem Euchromatin außerhalb von Chromozentren in Interphasekernen assoziiert. Weiterführend sollten auch zytologische und ChIP-Analysen zur Lokalisation von H3.1-V5/His unter Kontrolle des endogenen Promotor und H4-V5/His unter der Kontrolle des 35S-Überexpressionspromotors durchgeführt werden. In genomweiten ChIP-Sequenzierungsanalysen in *Arabidopsis* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mit einem *myc*-Epitop fusioniertes H3.1 (HTR13) unter der Kontrolle des endogenen Promotors mit transkriptionell inaktiven und perizentromeren Regionen und *myc*-H3.3 (HTR5) mit transkriptionell aktiven Regionen assoziiert ist (Stroud *et al.*, 2012). In diesen Analysen wurde zudem eine Antikorrelation von H3.1 und der Genexpression in *Arabidopsis* aufgezeigt. Außerdem korrelierte eine hohe Assoziation von H3.1 an Gen- und Promotorregionen mit DNA-Methylierung und Dimethylierung von H3K9 und Di- und Trimethylierung von H3K27 (Stroud *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde eine erhöhte Assoziation von H3.1 an transponiblen Elementen gefunden (Stroud *et al.*, 2012), was die Ergebnisse zur Assoziation von H3.1 an den Transposons *MULE*, *Ta2*, *AtSN1* und am *180bp-SINGLE REPEAT* sowie dem zentromeren *180bp*-Repeat (cen180) belegen (Abb. 3.21).

Massenspektrometrische Analysen wiesen in *Arabidopsis* erhöhte Modifizierungen von H3.1 mit den heterochromatischen Histonmodifizierungen H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 nach (Johnson *et al.*, 2004). Erhöhte Assoziationen der euchromatischen Methylierungen H3K36me1, H3K36me2 und H3K36me3 wurden im Vergleich dazu am H3.3 detektiert (Johnson *et al.*, 2004). In *Western-Blot*-Analysen konnten in Kooperationsarbeit von D. Demidov am H3.1-V5/His-Fusionsprotein die heterochromatischen Methylierungen H3K9me2 und H3K27me1 sowie Methylierungen von H3K4 und Acetylierungen von H3K9 und H3K27 detektiert werden (D. Demidov, pers. Mitteilung).

Im Vergleich zu H3.1 zeigt H3.3 eine positive Korrelation mit der Genexpression und ist demnach mit transkriptionell aktiven Genen assoziiert (Stroud *et al.*, 2012). Eine erhöhte Assoziation von H3.3 an aktiv transkribierten Genen wurde außerdem zuvor bereits in genomweiten Analysen in *Drosophila* und in Säugerzellen nachgewiesen (Wirbelauer *et al.*, 2005; Mito *et al.*, 2005). Außerdem korrelierte die H3.3-Assoziation an diesen Regionen mit erhöhten Mengen der euchromatischen H3K4-Monomethylierung und reduzierten heterochromatischen Histonmethylierungen, wie H3K9- und H3K27-Dimethylierung. H3.3 ist vorrangig mit CpG-Methylierung in kodierenden Regionen (*body methylation*), aber nicht mit CpNpG und CpNpN-Methylierung sowie mit Methylierungen in Promotorregionen assoziiert. Des Weiteren zeigten H3.3-reiche Regionen auch eine hohe Assoziation mit der DNA-Polymerase II, was eine Inkorporation von H3.3 an transkriptionell aktiven Genen belegt (Stroud *et al.*, 2012).

Die Verteilung der Histonvarianten im Chromatin von Pflanzen und Tieren scheint hochkonserviert zu sein. Neben der hohen Sequenzkonservierung der H3-Histonvarianten, in Pflanzen und Tieren unterscheiden sich H3.1 und H3.3 an nur vier Aminosäurepositionen, sind auch an der H3-Dynamik beteiligte Komponenten und Chaperone hochkonserviert. In Tieren und Pflanzen wird das kanonische H3.1 in einem DNA-replikationsabhängigen Prozess in das Chromatin eingebaut, was durch das Chaperon CAF-1 vermittelt wird (Schönrock *et al.*, 2006; Verreault *et al.*, 1996). Die H3.3-Histonvariante wird wiederum durch den HIRA-Komplex in einem DNA-replikationsunabhängigen Prozess in das Chromatin integriert (Nie *et al.*, 2014; Ahmad und Henikoff 2002). Vermutlich wird H3.3 an transkriptionell aktiven Regionen eingebaut, an denen das Chromatin aufgrund der Elongation durch die Polymerase II dekontensiert vorliegt.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse belegen die im Rahmen dieser Arbeit detektierte präferentielle Assoziation von H3.1-V5/His mit heterochromatischen Regionen und transkriptionell inaktiven Sequenzen und eine präferentielle Assoziation von H3.3-V5/His mit euchromatischen und transkriptionell aktiven Sequenzen. Die klonierten Histonfusionsproteine werden erfolgreich in Nukleosomen und in das Chromatin integriert. Zudem lassen sich die spezifischen eu- und heterochromatischen Anreicherungen der Fusionshistone auf die den Fusionskonstrukten zugrunde liegenden endogenen Histonvarianten zurückführen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Histonfusionsproteine H3.1-V5/His und H3.3-V5/His posttranslationalen Histonmodifizierungen unterliegen, welche in massenspektrometrischen Analysen genauer untersucht werden können. Damit ist in weiterführenden Untersuchungen eine Antikörper-

unabhängige Analyse von Histonmodifikationen in *Silencing*-Suppressormutanten möglich. Es ist wahrscheinlich, dass mit der selektiven Isolation des mit dem Heterochromatin assoziierten Histon H3.1 wichtige Erkenntnisse über bisher unbekannte Histonmodifizierungen gewonnen werden, die in die finalen Prozesse des heterochromatischen Gen-*Silencing* involviert sind.

## 5 Zusammenfassung

Zur Aufklärung der epigenetischen Prozesse, die transkriptionelles Gen-*Silencing* (TGS) an den transgenen *LUCIFERASE*-Repeats in *Arabidopsis thaliana* kontrollieren, wurden epigenetische Modifizierungen am *LUC*-Locus und RNA-Transkripte in verschiedenen Luc-Linien analysiert.

Transkriptionelle Aktivität des *LUC*-Repeats konnte in der Linie Luc1 und in der partiell inaktivierten Linie Luc2 durch den Nachweis von kodierender polyadenylierter *LUC*-mRNA nachgewiesen werden. Die Expression des *LUC*-Gens korreliert in diesen beiden Linien mit signifikanten euchromatischen Histonmodifizierungen durch H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac und H3K36me2 am *35S*-Promotor und in der kodierenden *LUC*-Region.

Ein *Silencing* des *LUC*-Transgens und der Grad der Inaktivierung wird darüber hinaus über spezifische heterochromatische Modifikationen des Chromatins vermittelt. Mit zunehmendem Grad der Inaktivierung in der partiell aktiven Linie Luc2 kommt es zu einer Etablierung von heterochromatischen Histonmodifizierungen an den *LUC*-Repeats, die in den transkriptionell inaktiven Linien Luc7 und Luc9 in einer erhöhten Assoziation mit den Histonmethylierungen H3K9me2 und H3K27me1 resultiert. Somit werden heterochromatische Chromatinstrukturen am *LUC*-Repeat über heterochromatische Histonmodifizierungen zellerblich kontrolliert.

In den Linien Luc6, Luc7, Luc9 und Luc12 liegen die *LUC*-Repeats transkriptionell inaktiv vor, an denen zwar keine polyadenylierte *LUC*-mRNA, aber nicht-polyadenylierte, nichtkodierende *antisense*- und *sense*-Transkripte transkribiert werden. Diese nichtkodierenden Transkripte am *LUC*-Repeat konnten als Polymerase V-abhängige Transkripte identifiziert werden. Die Pol V-Transkripte besitzen kein PolyA-Signal, überspannen sowohl nichtkodierende *35S*-Promotorbereiche als auch das kodierende *LUCIFERASE*-Gen und werden an multiplen Startpunkten initiiert.

Bei der Linie Luc8 wird, im Gegensatz zu allen anderen Luc-Linien, das *LUC*-Repeat durch posttranskriptionelles Gen-*Silencing* inaktiviert. In dieser Linie wird polyadenylierte *LUC*-mRNA synthetisiert, die wahrscheinlich mit Pol V-*antisense*-RNAs einen RNA-Doppelstrang (dsRNA) bildet und damit eine Degradierung von *LUC*-mRNA über RNA-Interferenz ermöglicht.

Mit den *Silencing*-Suppressormutanten wurden sowohl bekannte als auch neue epigenetische Kontrollfaktoren analysiert und ihre Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin und transkriptionellem Gen-*Silencing* (TGS) des *LUC*-Repeats untersucht. Der Nachweis von Polymerase V-Transkripten in den verschiedenen Suppressormutanten belegen, dass diese



Transkripte notwendig, aber nicht alleine ausreichend sind, um Gen-*Silencing* am *LUC*-Repeat zu etablieren. Vermutlich beeinflusst dabei AE7 die Transkription der Polymerase V am *LUC*-Repeat.

Die transkriptionelle Reaktivierung des *LUC*-Repeats korreliert in den meisten Suppressormutanten mit signifikant reduzierten heterochromatischen Methylierungen von H3K9me2 und/oder H3K27me1 und signifikanten Anstiegen der euchromatischen Modifizierungen H3K4me2 und/oder H3K9ac.

Die Identifizierung von *Silencing*-Suppressormutanten ohne signifikante Veränderungen der H3K9-Dimethylierung, H3K27-Monomethylierung und mit keiner oder nur schwacher Veränderung der DNA-Methylierung belegen darüber hinaus, dass eine Reaktivierung des *LUC*-Repeats auch unabhängig von einer Entfernung dieser epigenetischen Modifizierungen erfolgen kann. Jedoch setzt Gen-*Silencing* sowohl H3K27-Monomethylierung als auch DNA-Methylierung und H3K9-Dimethylierung am *LUC*-Repeat voraus. Am Ende finden bisher unbekannte epigenetische Prozesse statt, die essentiell für die finale Definierung von Gen-*Silencing* sind.

Der Einfluss von *Silencing*-Suppressormutanten auf endogene und transkriptionell inaktivierte transposable Elemente zeigt zudem auf, dass die identifizierten Faktoren eine generelle Funktion in der Aufrechterhaltung von heterochromatischen Strukturen und im transkriptionellen Gen-*Silencing* haben.

Zur weiteren Analyse des Einflusses von *Silencing*-Suppressormutanten auf Histonmodifizierungen und zur Identifikation neuer Histonmodifikationen, die am heterochromatischen Gen-*Silencing* des *LUC*-Transgens beteiligt sind, wurde ein *in vivo* Testsystem in *Arabidopsis* entwickelt. Dazu wurden H3.1-, H3.3- und H4-Histonfusionskonstrukte mit einem V5/His-Tag unter der Kontrolle des 35S-Promotors und des jeweiligen endogenen Promotors hergestellt und deren Expression in *Arabidopsis* erfolgreich nachgewiesen. Die Histonfusionsproteine werden entsprechend ihrer endogenen Histonvarianten in Nukleosomen des Eu- und Heterochromatins integriert. CHIP-Analysen belegen eine Assoziation des H3.1-V5/His Fusionsprotein am *LUC*-Locus. Der Einbau von H3.1-V5/His in Nukleosome am *LUC*-Transgen ist eine wichtige Voraussetzung für die weiterführenden Analysen zur Aufklärung von *Silencing*-Mechanismen am *LUC*-Repeat. In Kooperation mit D. Demidov (IPK, Gatersleben) konnten die Fusionshistone H3.1-V5/His und H3.3-V5/His im großen Maßstab über eine NiNTA-Chromatographie spezifisch aufgereinigt und isoliert werden. Dies erlaubt eine differenzielle Analyse von euchromatisch und heterochromatisch lokalisierten Histonen. Die Histonfusionsproteine H3.1-V5/His und

H3.3-V5/His unterliegen posttranslationalen Histonmodifizierungen und können somit in massenspektrometrischen Analysen untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmad K, Henikoff S (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9: 1191–1200.
- Allshire RC, Javerzat JP, Redhead NJ, Cranston G (1994) Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* 76: 157-169.
- 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. *Nucleic Acids Res* 33(16): 5199-207.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Assaad FF, Signer ER (1992) Somatic and germinal recombination of a direct repeat in *Arabidopsis*. *Genetics* 132: 553-566.
- Assaad FF, Tucker KL, Singer ER (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant. Mol. Biol.* 22: 1067-1085.
- Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M (2002) RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 99(Suppl. 4), 16499–16506.
- Aufsatz W, Mette MF, Matzke AJ, Matzke M (2004) The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol Biol.* 54(6):v793-804.
- 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*. *The Plant Journal* 58: 333–346.
- Barrero JM, González-Bayón R, del Pozo JC, Ponce MR, Micol JL (2007) INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA Polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19(9): 2822-38.
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427: 164–167.
- Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, von Haeseler A, Mittelsten Scheid O (2010) Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic States in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 22(1): 34-47.
- Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen RB (2001) The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 29(21): 4319–4333.
- Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 3(9): e3156.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Bérubé NG, Smeenk CA, Picketts DJ (2000) Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Hum Mol Genet.* 9(4): 539-47.
- Birnboim HC, Doly J (1979) *Nucl. Acid. Res.* 7: 1513-1519.

- Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, *et al* (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799–816.
- Blatch GL, Lassle M (1999) The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein–protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939.
- Böhmendorfer G, Rowley MJ, Kuciński J, Zhu Y, Amies I, Wierzbicki AT (2014) RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. *Plant J.* 79(2): 181-91.
- Brandstätter J, Rossbach C, Theres K (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* 192: 69-74.
- Brzeski J, Jerzmanowski A (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem.* 278(2): 823-8.
- Butler JEF, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Dev.* 2002. 16: 2583-2592.
- Cam HP, Chen ES, Grewal SIS (2009). Transcriptional scaffolds for heterochromatin assembly. *Cell* 136: 610–614.
- Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL (2011) Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* 25: 1915–1927.
- Cao X, Jacobsen SE (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology* 12(13):1138-44.
- Carcamo J, Buckbinder L, Reinberg D (1991) The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(18): 8052-6.
- Castel SE, Martienssen RA (2012) RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet.* 14(2): 100-12.
- Catcheside DG (1938) A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 38: 345-352.
- Catcheside DG (1949) A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 48: 31-42.
- Chalkley GE, Verrijzer CP (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: A TAFII250 TAFII150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18: 4835–4845.
- Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303(5662): 1336.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F, Rouhier N (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front Plant Sci.* 4: 259.
- Dalal Y, Wang H, Lindsay S, Henikoff S (2007) Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells. *PLoS Biol.* 5(8): e218.
- Davies GJ, Sheikh MA, Ratcliffe OJ, Coupland G, Furner IJ (1997) Genetics of homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*; a role for methylation. *Plant J.* 12(4): 791-804.
- Daxinger L, Kanno T, Bucher E, van der Winden J, Naumann U, Matzke AJ, Matzke M (2009) A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBO J.* 28(1): 48-5

- De Lucia F, Dean C (2011) Long non-coding RNAs and chromatin regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 168-173.
- Demidov Dmitri Dr., Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben
- Depicker A, Montagu MV (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 373-382.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA *et al.* (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489(7414): 101-8.
- Douet J, Tutois S, Tourmente S (2009) A Pol V-mediated silencing, independent of RNA-directed DNA methylation, applies to 5S rDNA. *PLoS Genet.* 5(10): e1000690.
- Earley, K., Lawrence, R.J. and Pontes, O (2006) Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev.* 20: 1283–1293.
- Earley KW, Shook MS, Brower-Toland B, Hicks L, Pikaard CS (2007) In vitro specificities of *Arabidopsis* co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J.* 52(4): 615-26.
- Earley KW, Pontvianne F, Wierzbicki AT, Blevins T, Tucker S, Costa-Nunes P, Pontes O, Pikaard CS (2010) Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* 24(11): 1119-32.
- Ebbs ML, Bartee L, Bender J (2005) H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. *Mol Cell Biol.* 25(23): 10507-15.
- Ebbs ML, Bender J (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 18(5):1166-76.
- 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*. *Genes Dev* 18: 2973-2983.
- Eisen JA, Sweder KS, Hanawalt PC (2005) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 23(14):2715-23.
- ENCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489(7414): 57-74.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet.* 3(5): 329-41.
- Fiedler CR (2007) Molekulargenetische Analyse neuer Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Finke A, Kuhlmann M, Mette MF (2012) IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics* 7: 950–960.
- Finnegan EJ, Dennis ES (1993) Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res* 21: 2383-2388.
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998): 223-247.
- Finnegan EJ, Kovac KA (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 43: 189-201.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11.
- Fischer Andreas Dr., Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Franz P, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I (2002) Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14584–14589.
- Franz P, ten Hoopen R, Tessadori F (2006) Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 14(1): 71-82.
- Furner IJ, Sheikh MA, Collett CE (1998) Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: Genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* 149: 651-662.
- Gao Z, Liu HL, Daxinger L, Pontes O, He X, Qian W, Lin H, Xie M, Lorkovic ZJ, Zhang S, Miki D, Zhan X, Pontier D, Lagrange T, Jin H, Matzke AJ, Matzke M, Pikaard CS, Zhu JK (2010) An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 465: 106–109.
- Gari K, León Ortiz AM, Borel V, Flynn H, Skehel JM, Boulton SJ (2012) MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* 337(6091): 243-5.
- Garton S, Knight H, Warren GJ, Knight MR, Thorlby GJ (2007) Crinkled leaves 8--a mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase--leads to defects in leaf development and chloroplast division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50(1):118-27.
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C (2001) The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107:525–535.
- Gendrel AV, Lippmann Z, Yordan C, Colot V, Martienssen RA (2002) Dependence of heterochromatic Histone H3 Methylation patterns on the *Arabidopsis* Gene DDM1. *Science* 297: 1871-1873.
- Gerschke S (2011) Charakterisierung und molekulargenetische Analyse von *AE7*, einem neuen epigenetischen Faktor in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard ., Higgs DR (1995) Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with athalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80: 837-845.
- Gläser K (2010) Etablierung eines In-vivo-Testsystems zur massenspektrometrischen Analyse von Histonmodifikationen in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X, Wen D, Chappier A, DeKolver RC, Miller JC, Lee YL, Boydston EA, Holmes MC, Gregory PD, Grealley JM, Rafii S, Yang C, Scambler PJ, Garrick D, Gibbons RJ, Higgs DR, Cristea IM, Urnov FD, Zheng D, Allis CD (2010) Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140(5): 678-91.
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63: 751-762.
- Haag JR, Pontes O, Pikaard CS (2009) Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases Pol IV and Pol V are required for siRNA-dependent DNA methylation and gene silencing. *PLoS ONE* 4(1): e4110.
- Haag JR, Pikaard CS (2011) Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(8): 483-92.

- Haag JR, Ream TS, Marasco M, Nicora CD, Norbeck AD, Pasa-Tolic L, Pikaard CS (2012) In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. *Mol Cell*. 48(5): 811-8.
- Habu Y, Mathieu O, Tariq M, Probst AV, Smathajitt C, Zhu T, Paszkowski J (2006) Epigenetic regulation of transcription in intermediate heterochromatin. *EMBO Rep*. 7(12): 1279-84.
- Hafner M, Zimmermann K, Pottgiesser J, Krieg T, Nischt R (1995) A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription. *Matrix Biol*. 14(9): 733-41.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-951.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanowski H (2011) Funktionelle Analyse von Target-Loci des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors TTG2. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Heider A (2011) Charakterisierung und molekulargenetische Analyse neuer Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *I Jb wiss Bot* 69: 762-818.
- Henikoff S, Comai L (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149(1):307-18.
- Henikoff S, Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:133-53.
- Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331(6013): 76-9.
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118–120.
- Hirata A, Klein BJ, Murakami KS (2008) The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* 451(7180): 851-4.
- Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T (2000) Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12(3): 357-69.
- Holliday R (1994) Epigenetics: an overview. *Dev Genet* 15: 453-457.
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769(5-6): 358-74.
- Hyun Y, Yun H, Park K, Ohr H, Lee O, Kim D H, Sung S, Choi Y (2013) The catalytic subunit of *Arabidopsis* DNA polymerase  $\alpha$  ensures stable maintenance of histone modification. *Development* 140(1): 156-66.
- Hofmann Ingo Dr., Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Hofmann I (2004) Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I (2003) Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J*. 33(6): 967-73.

- Ingouff M, Rademacher S, Holec S, Soljić L, Xin N, Readshaw A, Foo SH, Lahouze B, Sprunck S, Berger F (2010) Zygotic resetting of the HISTONE 3 variant repertoire participates in epigenetic reprogramming in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 20(23): 2137-43.
- Irmiler K (2006) Funktionelle Analyse von Chromatinproteinen in *Arabidopsis thaliana* mittels FISH und CHIP. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416(6880): 556-60.
- Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T, Jacobsen SE (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112: 308-315.
- Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD (2009) ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 16(7): 763-8.
- Jenuwein T und Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
- Johnson L, Cao X, Jacobsen S (2002a) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol*. 12: 1360–1367.
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR (2002b) TRANSPARENT TESTA GLABRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14 (2002): 1359-1375.
- Johnson L, Mollah S, Garcia BA, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF, Jacobsen SE (2004) Mass spectrometry analysis of *Arabidopsis* histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Res* 32: 6511–6518.
- Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J, Jacobsen SE (2007) The SRA methylcytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol* 17(4): 379-84.
- Johnson, LM, Law JA, Khattar A, Henderson IR, Jacobsen SE (2008) SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. *PLoS* 4(11): e1000280.
- Johnson LM, Du J, Hale CJ, Bischof S, Feng S, Chodavarapu RK, Zhong X, Marson G, Pellegrini M, Segal DJ, Patel DJ, Jacobsen SE (2014) SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. *Nature* 507(7490): 124-8.
- Jordan A, Reichard P (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 71-98.
- Jovtchev G, Borisova BE, Kuhlmann M, Fuchs J, Watanabe K, Schubert I, Mette MF (2011) Pairing of lacO tandem repeats in *Arabidopsis thaliana* nuclei requires the presence of hypermethylated, large arrays at two chromosomal positions, but does not depend on H3-lysine-9-dimethylation. *Chromosoma* 120(6): 609-19.
- Kanno T, Huettel B, Mette M.F, Aufsatz W, Jaligot E, Daxinger L, Kreil DP, Matzke M, Matzke AJ (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* 37: 761–765.
- Kasschau KD, Fahlgren N, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Carrington JC (2007) Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs. *PLoS Biol*. 5(3): e57.
- Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen SE, Kakutani T (2003) Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in *Arabidopsis*. *Curr. Biol*. 13: 421–426.
- Kim DH and Sung S (2012) Environmentally coordinated epigenetic silencing of FLC by protein and long noncoding RNA components. *Curr Opin Plant Biol*. 15: 51-6.



- Kobe B, Deisenhofer J (1994) The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem Sci.* 19: 415–421.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396.
- Kou H, Zhou Y, Gorospe RM, Wang Z (2008) Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 105: 15714–15719.
- Körner S (2011) Funktionelle Analyse des *Silencing*-Suppressors RNR1 in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Krauss Veiko Dr., *Cluster of Excellence on Plant Sciences*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kuhlmann M, Mette MF (2012) Developmentally non-redundant SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 79(6): 623-33.
- Kumar D, Viberg J, Nilsson AK, Chabes A (2010) Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 38(12): 3975-83.
- Kummer K (2010) Molekulargenetische und funktionelle Charakterisierung von Komponenten des RNA-vermittelten *Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 14(3): 286-98.
- Lai EC, Burks C, Posakony JW (1998) The K box, a conserved 3' UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of enhancer of split complex transcripts. *Development* 125(20): 4077-88.
- Laman H, Balderes D, Shore D (1995) Disturbance of normal cell cycle progression enhances the establishment of transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3608-3617.
- Lauder S, Bankmann M, Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996) Dual requirement for the yeast MMS19 gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6783–6793.
- Laurent AM, Puechberty J, Prades C, Gimenez S und Roizes G (1997) Site-specific retrotransposition of L1 elements within human aliphoid satellite sequences. *Genomics* 15: 127-132.
- Law JA, Ausin I, Johnson LM, Vashisht AA, Zhu JK, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE (2010a) A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA- Directed DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 20(10): 951-6.
- Law MJ, Lower KM, Voon HP, Hughes JR, Garrick D, Viprasak V, Mitson M, De Gobbi M, Marra M, Morris A, Abbott A, Wilder SP, Taylor S, Santos GM, Cross J, Ayyub H, Jones S, Ragoussis J, Rhodes D, Dunham I, Higgs DR, Gibbons RJ (2010b) ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* 143(3): 367-78.
- Law JA, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE (2011) SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genet.* 7(7): e1002195.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell.* 13: 599–609.

- Lermontova I, Koroleva O, Rutten T, Fuchs J, Schubert V, Moraes I, Koszegi D, Schubert I (2011) Knockdown of CENH3 in *Arabidopsis* reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation. *Plant J.* 68(1): 40-50.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(32): 14075-80.
- Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell.* 126(1):93-106.
- Lima Di Faria A, Jaworska H (1968) Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* 217: 138-142.
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292(5524): 2077-80.
- Lindroth AM, Shultis D, Jasencakova Z, Fuchs J, Johnson L, Schubert D, Patnaik D, Pradhan S, Goodrich J, Schubert I, Jenuwein T, Khorasanizadeh S, Jacobsen SE (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J* 23: 4286-4296.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson BM (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307.
- Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T, Martinessen R (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *P.L.o.S. Biol.* 1: 420-428.
- Liu J, Ren X, Yin H, Wang Y, Xia R, Wang Y, Gong Z (2010) Mutation in the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  influences transcriptional gene silencing and homologous recombination in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 61: 36-45.
- Liu J, Jung C, Xu J, Wang H, Deng S, Bernad L, Arenas-Huertero C, Chua NH (2012a) Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24(11): 4333-45.
- Liu X, Yu CW, Duan J, Luo M, Wang K, Tian G, Cui Y, Wu K (2012b) HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158(1):119-29.
- Lobachev KS, Stenger JE, Kozyreva OG, Jurka J, Gordenin DA, Resnick MA (2000) Inverted Alu repeats unstable in yeast are excluded from the human genome. *EMBO J.* 19(14):3822-30.
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134: 1149-1174.
- Luff B, Pawlowski L, Bender J (1999) An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 3: 505-511.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
- Luo D, Bernard DG, Balk J, Hai H, Cui X (2012) The DUF59 family gene AE7 acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24(10): 4135-48.
- Lusser A, Kadonaga JT (2003) Chromatin remodeling by ATP- dependent molecular machines. *BioEssays* 25: 1192-1200.

- Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30: 329-334.
- Malagnac F, Bartee L, Bender J (2002) An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.* 21(24): 6842-52.
- Malik HS, Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol.* 10(11): 882-91.
- Martini E, Roche DM, Marheineke K, Verreault A, Almouzni G (1998) Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J Cell Biol.* 143: 563-575.
- Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 24(15): 2783-91.
- Matzke MA, Mette MF, Aufsatz W, Jakowitsch J, Matzke AJ (1999) Host defenses to parasitic sequences and the evolution of epigenetic control mechanisms. *Genetica* 107(1-3): 271-87.
- Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol.* 43(2-3): 401-15.
- Matzke M, Kanno T, Huettel B, Jaligot E, Mette FM, Kreil DP, Daxinger L, Rovina P, Aufsatz W, Matzke AJM (2005) RNA-directed DNA methylation. *Plant Epigenetics, Annual Plant Reviews* 19(3): 69-105.
- Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet.* 15(6): 394-408.
- May BP, Lippman ZB, Fang Y, Spector DL, Martienssen RA (2005) Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats. *PLoS Genet.* 1(6):e79.
- McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, O'Rourke DM, Bickmore WA, Pombo A, Turley H, Gatter K, Picketts DJ, Buckle VJ, Chapmani L, Rhodesi D, Higgs DR (1999) Localisation of a putative transcriptional regulator (hATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 13983-13988.
- Meinel S (2007) Molekulargenetische Analyse einer neuen putativen Nucleosomen-Remodelingfunktion in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19(19): 5194-201.
- Mette MF, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Rovina P, Matzke M, Matzke AJ (2005) Analysis of double-stranded RNA and small RNAs involved in RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Methods Mol Biol.* 309:61-82.
- Meyer P (2002) Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol. Biol.* 43: 221-234.
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133(1): 116-27.
- Mishiba K, Nishihara M, Nakatsuka T, Abe Y, Hirano H, Yokoi T, Kikuchi A, Yamamura S (2005) Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *Plant J* 44: 541-556.
- Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S (2005) Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet.* 37: 1090-1097
- Mittelsten Scheid O, Paszkowski J, Potrykus I (1991) Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112.

- Mittelsten Scheid O, Afsar K, Paszkowski J (1998) Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 632- 637.
- Mittelsten Scheid O, Probst AV, Afsar K, Paszkowski J (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(21): 13659-62.
- Mittelsten Scheid O, Afsar K, Paszkowski J (2003) Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 34: 450–454.
- Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H, Kakutani T Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411(6834): 212-4.
- Moazed D (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457: 413–420.
- Morel JB, Mourrain P, Beclin C, Vaucheret H (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 10: 1591-1594.
- Muller HJ (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 22: 299-334.
- Murfett J, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ (2001) Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* 13: 1047–1061.
- Myouga F, Tsuchimoto S, Noma K, Ohtsubo H, Ohtsubo E (2001) Identification and structural analysis of SINE elements in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genes Genet Syst* 76: 169–179.
- Nagaki K, Talbert PB, Zhong CX, Dawe RK, Henikoff S, Jiang JM (2003) Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics* 163: 1221–1225.
- Nagano H, Fukudome A, Hiraguri A, Moriyama H, Fukuhara T (2014) Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Res.* 42(3): 1845-56.
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich AC, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G (2005) Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 24: 1418–1429.
- Naumann U, Daxinger L, Kanno T, Eun C, Long Q, Lorkovic ZJ, Matzke M, Matzke AJ (2011) Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 187(3): 977-9.
- Nichols NM, Yue D (2008) Ribonucleases. *Curr Protoc Mol Biol*. Chapter 3: Unit3.13.
- Nie X, Wang H, Li J, Holec S, Berger F (2014) The HIRA complex that deposits the histone H3.3 is conserved in *Arabidopsis* and facilitates transcriptional dynamics. *Biol Open*. pii: BIO20148680.
- Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL (2005) Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. *Plant J.* 44(4): 557-68.
- Ogawa Y, Sun BK, Lee JT (2008) Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320(5881): 1336-41.
- Onodera Y, Haag JR, Ream T, Nunes PC, Pontes O, Pikaard CS (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120: 613–622.
- Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2008) *Arabidopsis* Demeter-Like proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biology* 67: 671-681.
- Osley MA (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem* 60: 827-861.

- Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW, Jorgensen RA (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30(23): 5036-55.
- Park YD, Papp I, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJ, Matzke MA (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9(2): 183-94.
- Park JA, Kim AJ, Kang Y, Jung YJ, Kim HK, Kim KC (2011) Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression. *Mol Cells.* 31(4): 343-9.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell.* 12(6): 1577-89.
- Pontes O, Li CF, Costa Nunes P, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen SE, Pikaard CS (2006) The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* 126: 79–92.
- Pontes O, Costa-Nunes P, Vithayathil P, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V functions in *Arabidopsis* interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Mol Plant.* 2(4): 700-10.
- Pontier D, Yahubyan G, Vega D, Bulski A, Saez-Vasquez J, Hakimi MA, Lerbs-Mache S, Colot V, Lagrange T (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 2030–2040.
- Pontvianne F, Blevins T, Pikaard CS (2010) *Arabidopsis* Histone Lysine Methyltransferases. *Adv Bot Res.* 53: 1-22.
- Prakash L, Prakash S (1977) Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 86(1): 33-55.
- Probst AV, Franz PF, Paszkowski J, Mittelsten Scheid O (2003) Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *The Plant Journal* 33: 743-749.
- Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, 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 rRNA repeats. *The Plant Cell* 16: 1021-1034.
- Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443: 1008–1012.
- Ream TS, Haag JR, Wierzbicki AT, Nicora CD, Norbeck AD, Zhu JK, Hagen G, Guilfoyle TJ, Pasa-Tolić L, Pikaard CS (2009) Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell* 33(2): 192-203.
- Richter K (2008) Charakterisierung und molekularbiologische Analyse neuer Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Roe JL, Durfee T, Zupan JR, Repetti PP, McLean BG, Zambryski PC (1997) TOUSLED is a nuclear serine/threonine protein kinase that requires a coiled-coil region for oligomerization and catalytic activity. *J Biol Chem.* 272(9): 5838-45.

- Sauge-Merle S, Falconet D, Fontecave M (1999) An active ribonucleotide reductase from *Arabidopsis thaliana* cloning, expression and characterization of the large subunit. *Eur. J. Biochem.* 266: 62-69.
- Saze H, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genet.* 34: 65-69.
- Schlensog M (2012) Nachweis und Analyse von nichtkodierenden Transkripten der pflanzen-spezifischen RNA-Polymerasen IV und V am inaktivierten Luciferase-Locus. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS *et al.* (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326(5956): 1112-5.
- 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. *EMBO J.* 21: 1121-1131.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18: 1251–1262.
- Schönrock N, Exner V, Probst A, Gruissem W, Hennig L (2006) Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 281(14): 9560-8.
- 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. *EMBO J* 25: 4638–4649.
- Shi L, Wang J, Hong F, Spector DL, Fang Y (2011) Four amino acids guide the assembly or disassembly of *Arabidopsis* histone H3.3-containing nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(26): 10574-8.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001) Fire On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107(4): 465-76.
- Singer T, Yordan C, Martienssen RA (2001) Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev.* 15(5):591-602.
- Soppe WJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, Jacobsen SE, Schubert I, Franz P (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J* 21: 6549–6559.
- Stam M, Mol JNM, Kooter JM (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79: 3-12.
- Stewart MD, Li J, Wong J (2005) Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol.* 25(7): 2525-38.
- Stevenson DS, Jarvis P (2003) Chromatin silencing: RNA in the driving seat. *Curr Biol.* 13(1): R13-5.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Stroud H, Otero S, Desvoyes B, Ramírez-Parra E, Jacobsen SE, Gutierrez C (2012) Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5370–5375.
- Stroud H, Greenberg MV, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE (2013) Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell* 152(1-2): 352-64.

- Ströder K (2010) Molekulargenetische Analysen zur Lokalisierung des endogenen bzw. transgen überexprimierten Chromatin-Remodeling-Faktors ATRXL1. Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ströder K (2012) Untersuchungen zum Einfluss epigenetischer Faktoren auf Nukleosomenpositionierung und Nukleasesensitivität in *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sussel L, Vannier D, Shore D (1995) Suppressors of defective silencing in yeast: Effects on transcriptional repression at the HMR locus, cell growth and telomere structure. *Genetics* 141: 873–888.
- Takeda S, Tadele Z, Hofmann I, Scheel D, Angelis KJ, Shibahara K, Kaya H, Araki T, Probst AV, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J (2004) BRU1, a novel nuclear factor essential for genetic and epigenetic inheritance and meristem function in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18: 782-793.
- Tariq M, Saze H, Probst AV, Lichota J, Habu Y, Paszkowski J (2003) Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8823-8827.
- Tariq M, Paszkowski J (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 20: 244-251.
- Tartof KD, Hobbs C, Jones M (1984) A structural basis for variegating position effects. *Cell* 37(3): 869-78.
- Tenea GN, Spantzel J, Lee LY, Zhu Y, Lin K, Johnson SJ, Gelvin SB (2009) Overexpression of several *Arabidopsis* histone genes increases agrobacterium-mediated transformation and transgene expression in plants. *Plant Cell.* 21(10): 3350-67.
- Thomas CE, Kelleher NL, Mizzen CA (2006) Mass spectrometric characterization of human histone H3: A bird's eye view. *J Proteome Res* 5: 240–247.
- Thümmler A (2004) Molekulare und cytologische Analyse von Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Töpfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* 15(14): 5890.
- Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G, Colot V (2007) *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet.* 3(6): e86.
- Vaillant I, Schubert I, Tourmente S, Mathieu O (2006) MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 7(12): 1273-8.
- Vaughn MW, Martienssen RA (2005) Finding the Right Template: RNA Pol IV, a Plant-specific RNA Polymerase. *Molecular Cell* 17(6):754-6.
- Vaucheret H, C Beclin, T Elmayan, F Feuerbach, C Godon, JB Morel, P Mourrain JC Palauqui, S Vernhettes (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16: 651–659.
- Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87(1): 95-104.
- Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC (2004) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.* 11(2): 137-46.
- Waddington CH (1942) The Epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20.
- Wang C, Liu Z (2006) *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell* 18(2): 350-65.

- Wang Y, Liu J, Xia R, Wang J, Shen J, Cao R, Hong X, Zhu JK, Gong Z (2007) The protein kinase TOUSLED is required for maintenance of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 8(1): 77-83.
- Wang H, Chung PJ, Liu J, Jang IC, Kean MJ, Xu J, Chua NH (2014) Genome-wide identification of long noncoding natural antisense transcripts and their responses to light in *Arabidopsis*. *Genome Res.* 24(3): 444-53.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576.
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468: 790-795.
- Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135: 635-648.
- Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet.* 41(5):630-634.
- Wierzbicki AT (2012) The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr Opin Plant Biol.* 15(5):517-22.
- Wierzbicki AT, Cocklin R, Mayampurath A, Lister R, Rowley MJ, Gregory BD, Ecker JR, Tang H, Pikaard CS (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* 26(16): 1825-36.
- Wirbelauer C, Bell O, Schübeler D (2005) Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev* 19: 1761-1766.
- Wolffe A (1998) Chromatin: Structure and Function. *Academic Press*, San Diego, CA.
- Wong LH, McGhie JD, Sim M, Anderson MA, Ahn S, Hannan RD, George AJ, Morgan KA, Mann JR, Choo KH (2010) ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 20(3): 351-60.
- Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES, Helliwell CA (2006) The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(39): 14631-6.
- Wutz A (2003) RNAs templating chromatin structure for dosage compensation in animals. *Bioessays* 25: 434-442.
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol.* 40(4): 711-7.
- Xie Z, Qi X (1779) Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochemica et Biophysica Acta* 720-724.
- Xu L, Zhao Z, Dong A, Soubigou-Taconnat L, Renou JP, Steinmetz A, Shen WH (2008) Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol.* 28(4):1348-60.
- Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X (2006) HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34: 667-675.



- Ye F, Signer ER (1996) RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 10881-10886.
- Yuan Z, Luo D, Li G, Yao X, Wang H, Zeng M, Huang H, Cui X (2010). Characterization of the AE7 gene in *Arabidopsis* suggests that normal cell proliferation is essential for leaf polarity establishment. *Plant J.* 64: 331–342.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101(1): 25-33.
- Zappulla DC, Cech TR (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 101: 10024-10029.
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328(5980): 916-9.
- Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D (2013) The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153(1): 193-205.
- Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2009) Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 10(6): R62.
- Zheng Q, Rowley MJ, Böhmendorfer G, Sandhu D, Gregory BD, Wierzbicki AT (2013) RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12034.
- Zhong X, Hale CJ, Law JA, Johnson LM, Feng S, Tu A, Jacobsen SE (2012) DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat Struct Mol Biol.* 19(9): 870-5.
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716–719.

## 7 Anhang

### 7.1 Primerliste

**Tab. 7.1: Verwendete Primer für Klonierung, RT-PCR und ChIP-Analysen.** Eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in den Primersequenzen grau markiert.

Primername	Sequenz	Quelle
<b>Primer für ChIP-Analysen</b>		
LucChIP2for	5' CCGCCGCCGTTGTTGTTTTG 3'	
LucChIP4rev	5' CTTTTTCGCGGTTGTTACTTGAC 3'	
35SChIP10for	5' CGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAG 3'	
35SChIP14rev	5' GCGAAGGATAGTGGGATTGTG 3'	
Tub ChIP for (TUA4)	5' GCTGTTGGTGGAGGGACTGG 3'	<i>Ay et al., 2009</i>
Tub ChIP rev (TUA4)	5' CCTGTGGAGATGGGTAAACTGTG 3'	
180bpSR ChIP for	5' GAATCTCAACCGTTCTCAAAAAG 3'	<i>Ay et al., 2009</i> und
180bpSR ChIP rev	5' CCTCGTCTGCTATCAATGTGGA 3'	<i>Mathieu et al., 2005</i>
PFK for	5' CCATGTGCATCTCTCTCAAGC 3'	<i>Jovtchev et al., 2011</i>
PFK rev	5' GTCTTAGCCGAAGGAAACGTC 3'	
AtSN1 for (F4)	5' AAAATAAGTGGTGGTTGTACAAGC 3'	<i>Herr et al., 2005</i>
AtSN1 rev (ATS15)	5' ACCAACGTGCTGTTGGCCAGTGGTAAATC 3'	
Ta2 for (JP1725)	5' AAACGATGCGTTGGGATAGGTC 3'	<i>Johnson et al., 2002</i>
Ta2 rev (JP1726)	5' ATACTCTCCACTTCCCGTTTTCTTTTA 3'	
Cen180 Fc	5' GGTTAGTGTTTTGGAGTCGAATATG 3'	<i>May et al., 2005</i>
Cen180 Rc	5' TTGCTTCTCAAAGATTCATGGT 3'	
<b>Primer für RT-PCR Analysen</b>		
LUC1 RT for	5' TGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG 3'	
LUC2 RT rev	5' CGCAACTGCAACTCCGATAAATAACG 3'	
LUC3 RT for	5' TCGC CCCGCGAACGACATTTAT 3'	
LUC4 RT rev	5' GAGCGACACCTTTAGGCAGACCAGTA 3'	
LUC5 RT rev	5' CGGAAA ACTCGACGCAAGAAAAATCAGA 3'	
35S RT	5' TCGTGCTCCACCATGTTGACCTGC 3'	
35S ChIP14rev	5' GCGAAGGATAGTGGGATTGTG 3'	
TUB4 RT for	5' TCATTGGGAGGAGGAACTGGAT 3'	
TUB4 RT rev	5' GTGAAGCCTTGGGAATGGGATAA 3'	
Athila6 3RT for	5' GCACTGCTTGATTACATTCCAGA 3'	
Athila6 278RT rev	5' ACCAGGGGGTCGAGTAGTGTTCATC 3'	
CACTA 137RTfor	5' AGCCACTGTCCAGAGCATTTTTG 3'	
CACTA 448RTrev	5' TGCCTCATCTCCCTTTTCCTTCC 3'	

MULE-F2	5' CTGTCCGCGAGTGTCATCAAGTAGC 3'	Mathieu <i>et al.</i> , 2005
MULE-R2	5' GATACTTGTTGACAAGTGTTTAGCAAGCC 3'	
AtSN1 for (F4)	5' AAAATAAGTGGTGGTTGTACAAGC 3'	Herr <i>et al.</i> , 2005
AtSN1 rev (ATS15)	5' ACCAACGTGCTGTTGGCCAGTGGTAAATC 3'	

---

**Primer für RACE-PCR**


---

5' GeneRacer	5' CGACTGGAGCACGAGGACACTGA 3'	www.lifetechnologies.com
5' GeneRacer nested	5' GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'	www.lifetechnologies.com

---

**Primer für Vektorsequenzierungen**


---

T7 Primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	www.promega.de
pGEMT for	5' GCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG 3'	
RightBorderpCB302for	5' AACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAA 3'	
Ac5 Forward (pAc5.1)	5' ACACAAAGCCGCTCCATCAG 3'	www.lifetechnologies.com

---

**Primer für Histonklonierungen**


---

***P35S::H3.1-V5/His***

At5g65360Xba for	5' ATATCTAGAATGGCTCGTACCAAGCAAACCG 3'
At5g65360Apa rev	5' ATAGGGCCCAGCCCT CTCGCCTCTAATTCTC 3'

***PH3.1::H3.1-V5/His***

At5g65360PromKpn for	5' ATAGGTACCTTGAAAATTAATACACATGG 3'
At5g65360PromApa rev	5' ATAGGGCCCAGCCCTCTCGCCTCTAATTC 3'

***P35S::H3.3-V5/His***

At4g40040Xba for	5' ATATCTAGAATGGCTCGTACTAAGCAAACAGCTC 3'
At4g40040Apa rev	5' ATAGGGCCCAGCACGTTCTCCTCTGATCCTG 3'

***PH3.3::H3.3-V5/His***

At4g40040PromXhofor	5' ATACTCGAGCCGAAAGTTTGACTGGTG 3'
At4g40040PromApa rev	5' ATAGGGCCCAGCACGTTCTCCTCTGATCCTG 3'

***P35S::H3.3[Synthetisch]-V5/His***

H3Synth Xba for	5' ATATCTAGAATGGCAAGGACGAAACAGACTGC 3'
H3Synth Apa rev	5' ATAGGGCCCAGCCTGCCCTCTCCCCACGT 3'

***P35S::H4-V5/His***

At1g07820Xba for	5' ATATCTAGAATGTCTGGGAAGAGGAAAG 3'
At1g07820Apa rev	5' ATAGGGCCCACCTCCGAAACCGTAGAG 3'

***PH4::H4-V5/His***

At1g07820PromEco for	5' ATAGAATCCTTAGGGCCCAATACTAGC 3'
At1g07820PromXba rev	5' ATATCTAGAACCTCCGAAACCGTAGAG 3'

**Zusätzlich verwendete Kontrollprimer**

Histone V5-Start	5' ATAGGATCCTATCCAGCACAGTGG CGG 3'	Gläser 2010
Histone V5-Stop	5' ATAGGATCCTCAATGGTGATGGTGATG 3'	
RightBorderpCB302for	5' AACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAA 3'	
35Sfor	5' CGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAG 3'	

## 7.2 Dot-Blot-Analysen

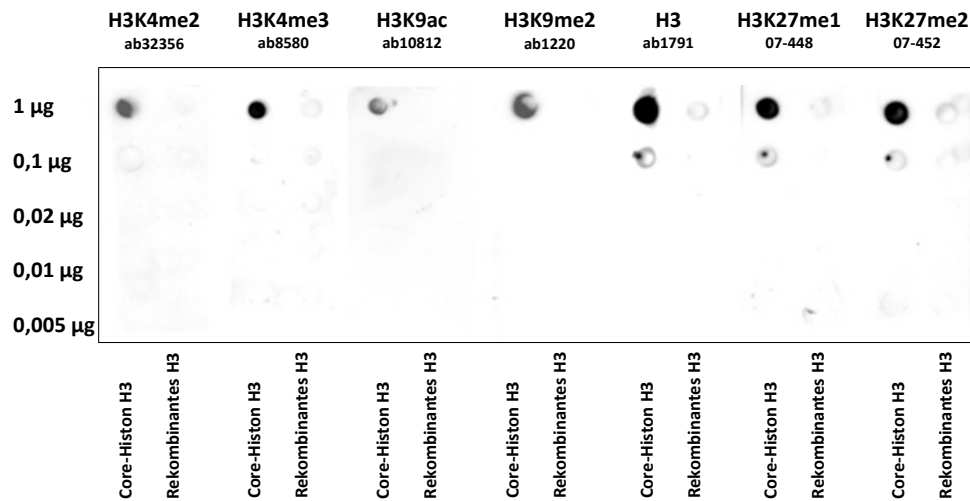


Abb. 7.1: Dot-Blot zur Analyse der Spezifikation von Antikörpern. Es wurden jeweils 1 µg Core-Histon (Chicken) und 1 µg rekombinantes Histon H3 (unmodifiziert) sowie vier weitere Verdünnungen (0,1 µg, 0,02 µg, 0,01 µg, 0,005 µg) aufgetragen.

## 7.3 Histonalignements

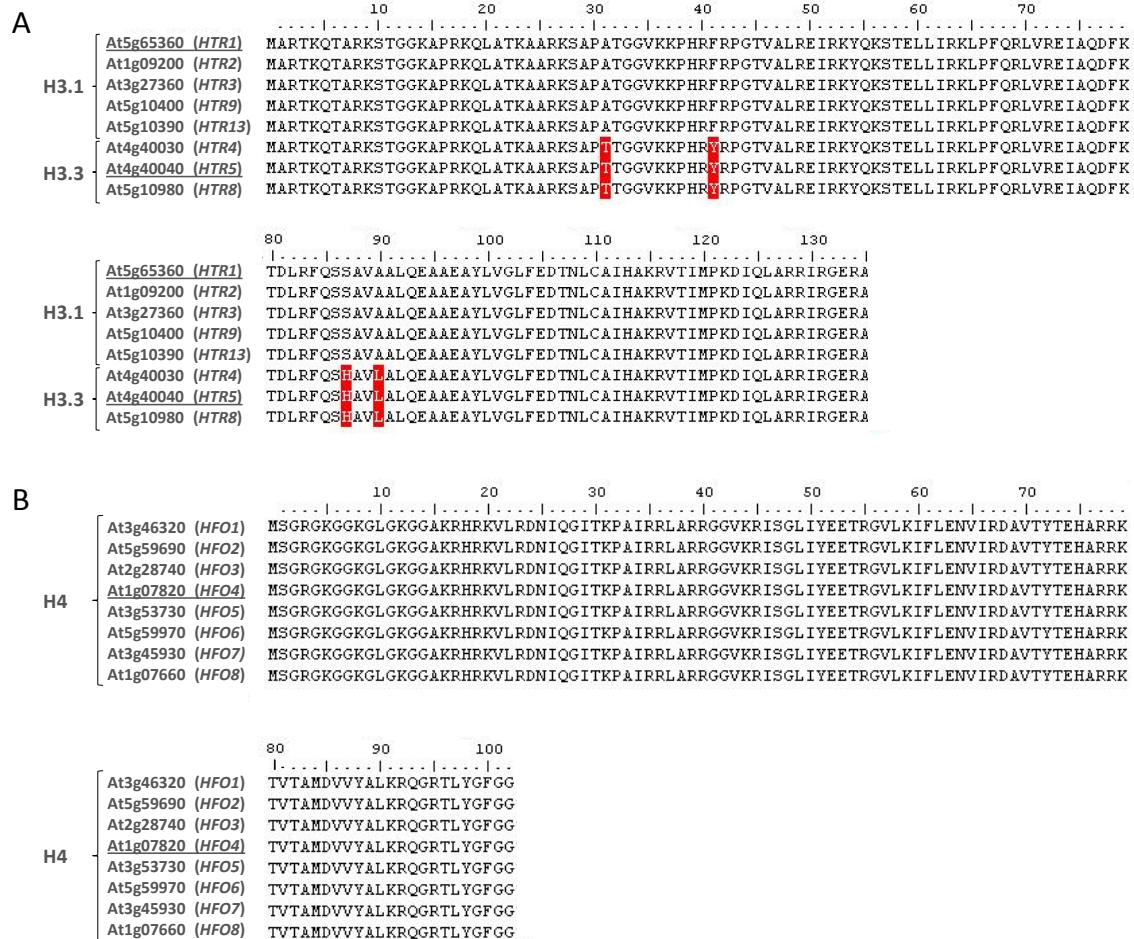
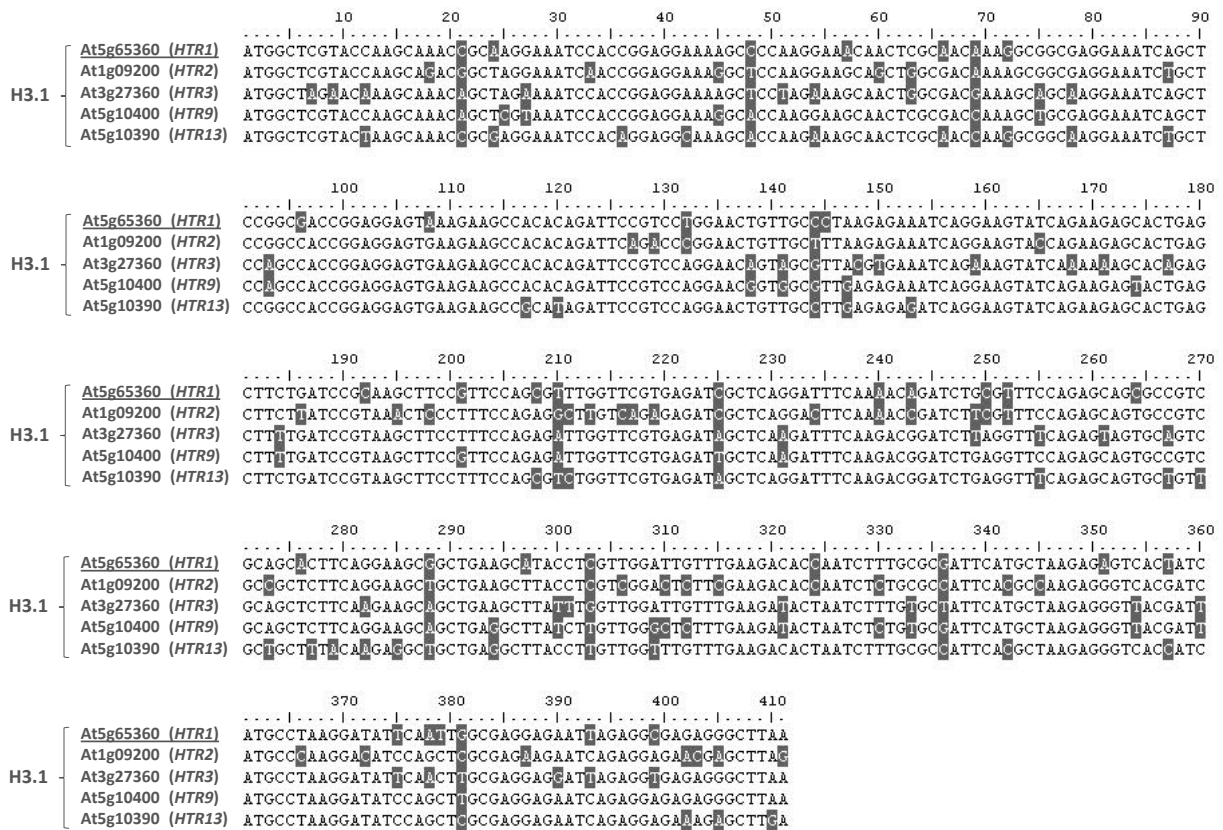
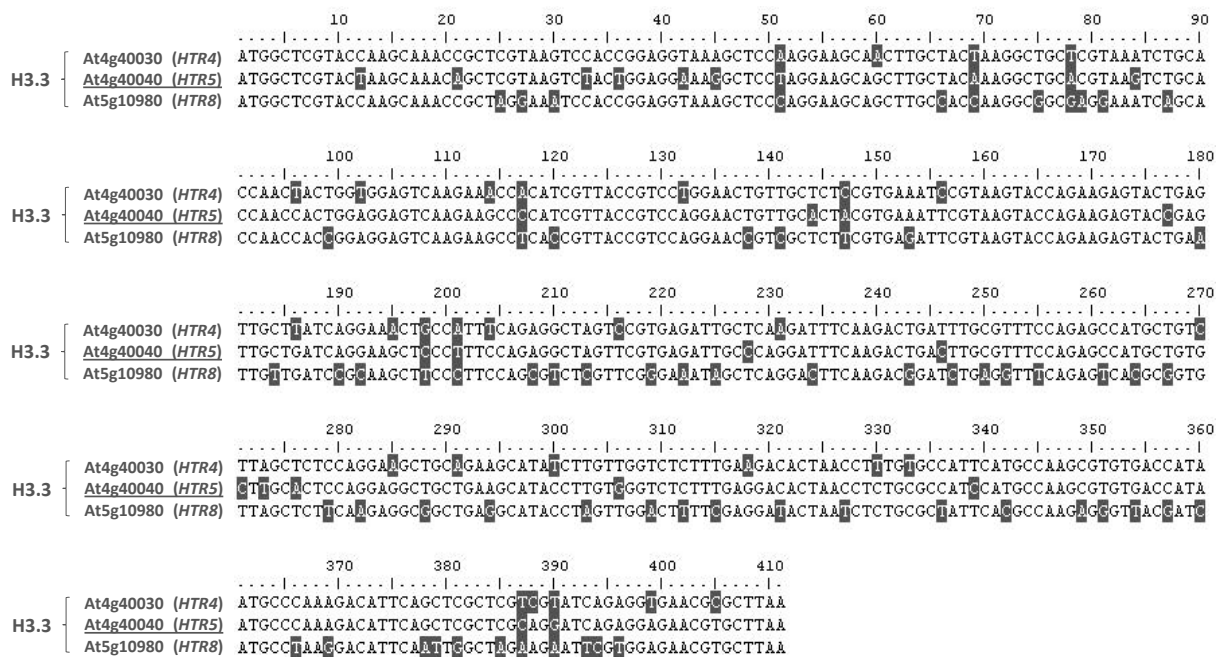


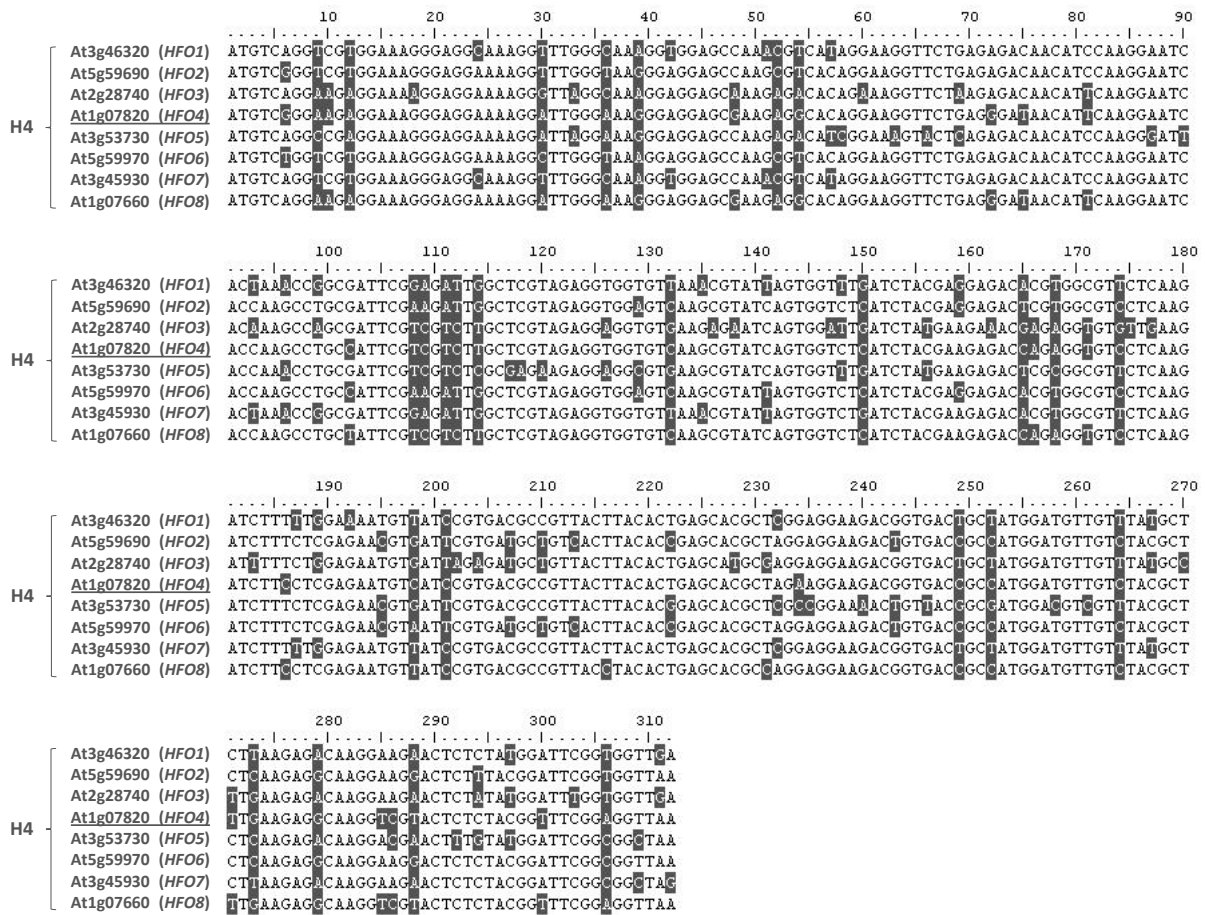
Abb. 7.2: Alignment der durch multiple Gensequenzen kodierten Proteinsequenz von H3.1, H3.3 und H4 in *Arabidopsis thaliana*. (A) Fünf Gene kodieren für die Histonvariante H3.1 und drei Gene kodieren für H3.3. (B) Acht Gene kodieren für H4. Die vier Aminosäurepositionen 31, 41, 87 und 90, an denen sich H3.1 und H3.3 unterscheiden, sind rot markiert. Die unterstrichenen Gene (*HTR1*, *HTR5* und *HFO4*) wurden jeweils zur Klonierung der Histonkonstrukte verwendet.



**Abb. 7.3: Alignment der fünf Gensequenzen, die für H3.1 kodieren.** Basenpaarunterschiede in den einzelnen kodierenden Sequenzen (CDS) sind durch graue Kästen markiert. Das unterstrichene Gen *At5g65360 (HTR1)* wurde zur Klonierung verwendet.



**Abb. 7.4: Alignment der drei Gensequenzen, die für H3.3 kodieren.** Graue Kästen markieren Basenpaarunterschiede in den einzelnen kodierenden Gensequenzen (CDS). Zur Klonierung wurde das unterstrichene Gen *At4g40040 (HTR5)* verwendet.



**Abb. 7.5:** Alignment der acht Gensequenzen, die für H4 kodieren. Graue Kästen markieren Basenpaarunterschiede in den einzelnen kodierenden Gensequenzen (CDS). Zur Klonierung wurde das unterstrichene Gen *At1g078200* (*HFO4*) verwendet.

## 7.4 Herstellung der T-DNA-Histonfusionskonstrukte

### Konstrukte *P35S::H3.3-V5/His* und *P35S::H3.3[Synthetisch]-V5/His*

Die beiden kodierenden Gensequenzen für H3.3 wurden mit den genspezifischen Primern (At4g40040Xbafor/At4g40040Aparev bzw. H3Synth Xbafor/ H3Synth Aparev) aus einer  $\lambda$ -ZAP-cDNA-Bibliothek unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *XbaI* und *Apal* an den dafür endständig eingefügten Restriktionsschnittstellen verdaut und in den Vektor pAc5.1-V5/His ligiert. Der Ausschnitt von *H3.3* mit dem C-terminalen V5/His-Tag erfolgte über nacheinander durchgeführte Verdaue mit einmal *MssI* (=PmeI) und anschließend mit *XhoI*. Das *H3.3-V5/His*-Konstrukt wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen für *SmaI* und *XhoI* in den 35S-Promotor enthaltenden Vektor pRT100 ligiert. Über *PstI* wurde die gesamte *CaMV-35S::H3.3-V5/His-CaMV-PolyA*-Sequenz aus pRT100 ausgeschnitten und ungerichtet in die Multiklonierungsstelle 2 des Transformationsvektors pCB302 liegiert. Zur Transformation in *Agrobacterium* wurde mit der Primerkombination rightborderpCB302for und 35Sfor Klonierungsvektoren mit *P35S::H3.3-V5/His* in gleicher Orientierung zum *BAR*-Gen selektiert.

### Konstrukt *P35S::H4-V5/His*

Zunächst wurde durch PCR an einer  $\lambda$ -ZAP-cDNA-Bibliothek die kodierende Sequenz des Gens *At1g07820* mit den genspezifischen Primern At1g07820Xbafor und At1g07820Aparev unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und über die Primer endständige Restriktionsschnittstellen eingefügt. Über diese Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *Apal* erfolgte die Ligation in pAc5.1-V5/His. Mit *EcoRI* und *MssI* (=PmeI) wurde die *H4-V5/His*-Sequenz aus dem pAc5.1-V5/His ausgeschnitten und über die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *SmaI* in den *CaMV-35S*-Expressionsvektor pRT101 ligiert. Die entstandene Expressionskassette aus *CaMV-35S*-Promotor, *H4*-Gen und *CaMV-Poly-A*-Signal wurde über die beiden flankierenden *HindIII*-Schnittstellen ungerichtet in die Multiklonierungsstelle 1 der T-DNA des binären Vektors pCB302 kloniert. Zur Transformation in *Agrobacterium* wurde mit der Primerkombination RightBorderpCB302for und At1g07820Xbafor Klonierungsvektoren mit *P35S::H4-V5/His* in gleicher Orientierung zum *BAR*-Gen selektiert.

**Konstrukt *PH3.1::H3.1-V5/His***

Unter der Verwendung der *Pfu*-Polymerase konnte kein PCR-Produkt mit den genspezifischen Primern *At5g65360PromKpnfor* und *At5g65360PromAparev* an genomischer DNA erhalten werden. Deswegen erfolgte die Amplifikation von *At5g65360*, inklusive einer 999 bp langen Sequenz stromaufwärts des Start-ATGs, mit der iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad). Anschließend fand eine Restriktion an den endständig eingefügten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *ApaI* und die Klonierung in den Vektor pAc5.1-V5/His statt. Durch die Restriktion mit *KpnI* und *MvaI269I* (= *BsmI*) unter Zugabe von Klenow-Fragment und dNTPs erfolgte der Ausbau der *PH3.1::V5/His-PolyA*-Kassette aus dem pAc-Vektor und die Herstellung von glatten Fragment-Enden. Diese Kassette wurde über *SmaI* ungerichtet in die Multiklonierungsstelle 2 des Transformationsvektors pCB302 kloniert. Mit der Primerkombination *RightBorderpCB302for* und *At5g65360PromKpnfor* wurden Vektoren mit der Klonierungskassette *PH3.1::H3.1-V5/His-PolyA* in gleicher Orientierung zum *BAR*-Gen selektiert.

**Konstrukt *PH3.3::H3.3-V5/His***

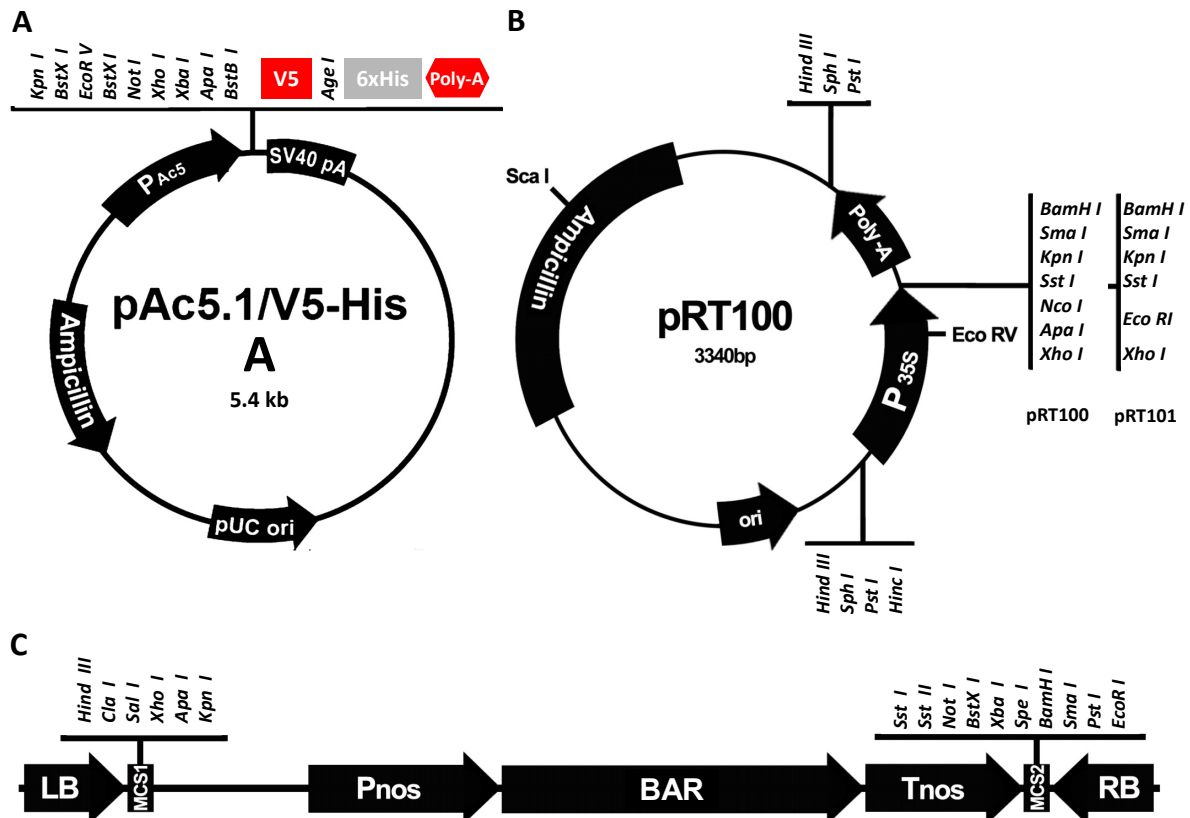
Die *H3.3*-Gensequenz, inklusive einer 864 bp langen Sequenz stromaufwärts des Start-ATGs, wurde mit genspezifischen Primern *At4g40040PromXhofofor* und *At4g40040PromAparev* unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase an genomischer DNA amplifiziert, an den endständig eingefügten Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *ApaI* verdaut und in pAc5.1-V5/His kloniert. Zur Klonierung in pCB302 wurde die *PH3.3::H3.3-V5/His-PolyA*-Kassette über *EcoRI* und *HpaI* aus dem pAc-Vektor ausgeschnitten. Die Ligation erfolgte in pCB302 über die Schnittstellen für *EcoRI* und *SmaI*. Zur Transformation in *Agrobacterium* wurde mit der Primerkombination *RightBorderpCB302for* und *At4g40040PromXhofofor* Klonierungsvektoren mit *PH3.3::H3.3-V5/His* in gleicher Orientierung zum *BAR*-Gen selektiert.

**Konstrukt *PH4::H4-V5/His***

Die Amplifikation der Gensequenz für *At1g07820*, inklusive einer 494 bp langen Sequenz stromaufwärts des Start-ATGs, erfolgte ebenfalls mit den genspezifischen Primern *At1g07820PromEcofofor* und *At1g07820PromXbarev* sowie der *Pfu*-Polymerase an genomischer DNA. Anschließend erfolgte die Restriktion an den endständig eingefügten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XbaI* und die Klonierung in pAc5.1-



V5/His. Über die Restriktion mit *EcoRI* und *MunI* (=MfeI) wurde die *PH4::H4-V5/His-PolyA*-Kassette ausgeschnitten. Die Zugabe von Klenow-Fragment ermöglichte die Herstellung von glatten Enden. Über die *SmaI*-Restriktionsschnittstellen erfolgte zuletzt die Klonierung in die Multiklonierungsstelle 2 des Transformationsvektor pCB302. Mit der Primerkombination rightborderpCB302for und At1g07820PromEcofor wurden Klonierungsvektoren mit *PH3.1::H3.1-V5/His* in gleicher Orientierung zum *BAR*-Gen selektiert.



**Abb. 7.6: Graphische Darstellung der verwendeten Vektoren.** (A) Der Vektor pAc5.1/V5-His A mit dem Selektionsmarker Ampicillin und der multiplen Klonierungsstelle zur Klonierung des C-terminalen V5-His-Tags. (B) pRT100 bzw. pRT101 mit der Expressionskassette mit *CaMV-35S*-Promotor (*P<sub>35S</sub>*), der jeweiligen multiplen Klonierungsstelle, der Poly-A-Sequenz und dem Selektionsmarker Ampicillin. (C) Dargestellt ist die pCB302-T-DNA mit linker *Border* (LB), rechter *Border* (RB), die beiden multiplen Klonierungsstellen 1 und 2 (MCS 1 und 2) sowie des BASTA<sup>®</sup>-Resistenzgen *BAR* mit Promotor (*P<sub>nos</sub>*) und Terminationssignal (*T<sub>nos</sub>*). Der Vektor pCB302 verfügt zusätzlich noch über ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) als Selektionsmarker (nicht in der Abbildung dargestellt).

### Publikationsliste

Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich AC, Dorn R, Jenuwein T, Reuter G (2005) Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 24(7): 1418-29.

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*. *Plant J.* 58(2): 333-46.

## Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Gunter Reuter für die Überlassung des vielfältigen Themas sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft, Betreuung und die umfangreichen Ideen und Vorschläge.

Ein großer Dank geht außerdem an den SFB648 für die finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andreas Fischer und Dr. Ingo Hofmann für die umfangreiche und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor, für die experimentellen Einweisungen, für die zahlreichen Ideen, Diskussionen, Ratschläge und Unterstützungen jeglicher Art. Besonders danke ich Ingo für die Verfügungsstellung von Samen und Pflanzenmaterial und für die Unterstützung bei der Anzucht sowie Andreas für die Hilfestellungen bei der Durchführung von immunozytologischen Analysen und mikroskopischen Untersuchungen sowie der Verwirklichung der Histonfusionskonstrukte und der Durchsicht dieses Manuskriptes.

Dr. Dmitri Demidov und Dr. A. Houben danke ich für die Kooperation und der Verfügungsstellung der synthetischen Histonsequenz und besonders Dmitri für die Kooperation zur Aufreinigung und Isolation der Fusionsproteine.

Prof. Vincent Colot und Francois Roudier danke ich für die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes in Evry und der Erlernung der CHIP- und CHIP-*on-Chip*-Techniken.

Nicole Ay danke ich für unsere freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit im Seneszenzprojekt und auch darüber hinaus, für die Einweisung in die *Real-Time*-PCR, für viele Tipps, Ratschläge und offene Ohren. Der gesamten AG Humbeck danke ich außerdem für die Möglichkeit zur Benutzung des *Real-Time*-PCR Gerätes.

Ein Dank geht auch an die Studenten, die im Rahmen von Diplomarbeiten, Bachelorarbeiten, Masterarbeiten, hilfswissenschaftlichen Tätigkeiten oder Praktikas zur Identifizierung und näheren Charakterisierung der *Silencing*-Suppressormutanten beigetragen haben und mir damit Arbeitsmaterial verschafft haben.

Katrin Kittlaus danke ich für die Sequenzanalysen und für die Zuarbeiten sowie Ramona Abe für die Bereitstellung von sauberen Reagenzgefäßen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik, besonders aber Andreas Fischer, Ingo Hofmann, Wiebke Kummer, Sandy Mietzsch, Kathleen Heidrich, Claudia Nickel, Sandro Lein, Olaf Nickel, Stefanie Beuch und Mathias Walther danke ich für die herzliche, freundschaftliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre, für den experimentellen Gedankenaustausch und die Hilfestellungen sowie für die zahlreichen Unternehmungen auch außerhalb des Laboralltages.

Der größte Dank gilt jedoch meiner geliebten Familie, die mich auf meinem Weg in vielfältiger Weise unterstützt hat. Ich danke euch für die bedingungslose Liebe und dass ihr in der schweren Zeit für mich da ward.

Alexander danke ich für seine Engelsgeduld, für die Fürsorge und Hilfe in meiner schweren Zeit und für seine Liebe darüber hinaus.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Die Analyse von heterochromatischem Gen-*Silencing* in *Arabidopsis thaliana*“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Halle/Saale, den 27.10.2014

Kristina Irmeler

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Kristina Irmeler  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 19.06.1981

### Werdegang

1988-1992 Grundschole Torgau  
1992-2000 Gymnasium Torgau, Abschluss Abitur  
2000 Aushilfstätigkeit in der Verwaltung des Kreiskrankenhauses Torgau "Johann Kentmann" gGmbH  
2000-2006 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2002-2005 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2005-2006 Diplomarbeit: „Funktionelle Analyse von Chromatinproteinen in *Arabidopsis thaliana* mittels FISH und CHIP“ am Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2006 Forschungsaufenthalt am Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) in Evry (Frankreich) in der Arbeitsgruppe von Prof. Vincent Colot.  
seit 2007 Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg