

**Molekulargenetische und funktionelle Analyse von
SUVH2, einem SU(VAR)3-9 homologen Protein in
*Arabidopsis thaliana***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie
Der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Kathrin Naumann
geb. am 12.11.1970 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. G. Reuter
2. Prof. Humbeck
3. Prof. Sonnewald

verteidigt am 23.06.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010456

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010456>]

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
A.th.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat-Na ₂ -Salz
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	doppelsträngige DNA- Kopie der mRNA
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat- Na ₂ -Salz
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin- Tetraessigsäure- Na ₂ -Salz
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	et alii, und andere
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	<i>β-Glucuronidase</i>
HMTase	Histon-Methyltransferase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LUC	Luziferase
mRNA	"messenger- RNA ", Boten- RNA
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Cloning Site
M&S	Murashige und Skoog
NOS	Nopalinsynthetase
NPT II	<i>Neomycinphosphotransferase</i>
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
OD	Optische Dichte

ORF	" <i>Open Reading Frame</i> ", offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEV	Positionseffekt- Variegation
PR- Protein	<i>pathogenesis- related protein</i> , Pathogen- induziertes Protein
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
rpm	Umdrehung pro min
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SAC	SET-Domänen assoziierte Cystein reiche Region
SET- Domäne	gemeinsame Domäne der Proteine <u>S</u> U(VAR)3-9, <u>E</u> (z) und <u>T</u> RITHORAX (<i>Drosophila melanogaster</i>)
ss	single strang, Einzelstrang
SSC	NaCl- Natriumcitrat- Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethyldiamin
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
usw.	und so weiter
WT	Wildtyp
X- Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-D- Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronid
z.Bsp.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Identifizierungssysteme für <i>TGS</i> -Suppressoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.2	DNA modifizierende Gene mit Einfluss auf den <i>TGS</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.3	Histon modifizierende Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.4	SET-Domänen Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.5	Die Rolle der Histon-Modifikationen in Eukaryoten	8
1.6	Ziele der Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Bakterienstämme / Bakterienanzucht und –behandlung	12
2.1.1	verwendete Bakterien	12
2.1.2	verwendete cDNA-Bibliotheken	12
2.1.3	Anzucht von <i>E. coli</i>	12
2.1.4	Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien	13
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.1	Material und Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.2	Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen	14
2.2.3	Transformation in <i>Arabidopsis thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.2.4	EMS- Mutagenese von Saatgut	15
2.2.5	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.3	Plasmide und Konstrukte	16
2.3.1	verwendete Expressionsvektoren	16
2.3.2	verwendete Konstrukte	17
2.3.3	Konstruktion des binären Vektors pBI 1.4tr	18
2.4	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA	18
2.4.1	Isolation von Plasmid- DNA nach alkalischer Methode (Birnboim and Doly, 1979)	18
2.4.2	Präparative Plasmidisolierung	19
2.4.3	Ligation	19
2.4.4	DNA Isolation <i>Arabidopsis</i>	20
2.4.5	Southern-Analyse	20
2.4.6	Transienter Expressionssay	21
2.4.7	DNA-Sequenzierung	22

2.5	PCR und DNA-Analysemethoden	22
2.5.1	DNA Amplifikation mittels PCR	22
2.5.2	TAIL- PCR	23
2.5.3	Inverse PCR	24
2.6	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	24
2.6.1	Isolation von Gesamt- RNA	24
2.6.2	RT-PCR	25
2.6.3	Quantitative <i>Real Time</i> PCR	25
2.7.	Affymetrix cDNA Expressionschip	26
2.8	Bioinformatik	26
3.	Ergebnisse	29
3.1	Identifizierung und Analyse pflanzlicher SET- Domänen Proteine	29
3.1.1	Charakterisierung des Proteins OsSET1 aus <i>Oryza sativa japonica</i>	29
3.1.2	Molekulare Analyse des Gens <i>SUVH2</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.2.	Charakterisierung transgener Linien zur funktionellen Analyse von SUVH 2	35
3.2.1	Überexpression von SET-Domänen Genen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.2.2.	Analyse der transgenen Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	35
3.2.2.1	Charakterisierung der Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	35
3.2.2.2	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression der <i>SUVH</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.2.3	Dosis abhängiger Effekt von SUVH2	41
3.2.3.1	Analyse der <i>svh2</i> SALK-Mutante und der transgenen Linien 35S*:: <i>SUVH2as</i>	41
3.2.3.2	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Transkription von <i>MET1</i> , <i>CMT3</i> und <i>DDM1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.3.	Einfluss von SUVH2 auf die genomweite Genexpression	46
3.3.1	Einfluss von SUVH2 auf die Expression von SET-Domänen Gene	46
3.3.2	Änderung der Expression von transponiblen Elementen	48
3.3.2.1	Der Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression des Retrotransposons <i>ATHILA</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
3.3.2.2	Einfluss von SUVH2 auf die Expression von verschiedenen Transposons	50
3.3.3	Einfluss von SUVH2 auf die Expression pflanzlicher Resistenz (R)-Gene	52

3.4	Einfluss von <i>SUVH2</i> auf <i>Transcriptional Gene Silencing</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
3.4.1	Dosis abhängiger Effekt von <i>SUVH2</i> auf das <i>Silencing</i> von LUC	55
3.4.1.1	Die Überexpression von <i>SUVH2</i> verstärkt das <i>Silencing</i> des Reportergens <i>LUZIFERASE (LUC)</i>	55
3.4.1.2	Die Reduktion des endogenen <i>SUVH2</i> verstärkt die Aktivität des Reporters <i>LUZIFERASE</i>	57
3.4.2	Einfluss der <i>ddm1-2</i> Mutante auf die Ausprägung des "mini-Pflanzen" Phänotyps	59
3.5	Molekulare und funktionelle Analyse der Domänen in <i>SUVH2</i>	61
3.6	Einfluss des Potyvirus <i>TuMV</i> auf die Expression der <i>SUVH</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.6.1	Induktion von <i>SUVH2</i> bei Virus-Infektion im Wildtyp	64
3.6.2	Induktion von <i>SUVH4</i> bei Virus-Infektion in der SALK Linie <i>suvh2</i>	67
4.	Diskussion	70
4.1	Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteinen in Pflanzen	70
4.2	Der Einfluss von <i>SUVH</i> -Proteinen auf die Ausprägung von Heterochromatin	71
4.3	<i>SUVH2</i> -abhängige Änderungen der Expression von SET-Domänen Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
4.4	Das <i>Silencing</i> von Retrotransposons in <i>Arabidopsis</i>	75
4.5.	Dosisabhängiger Effekt von <i>SUVH2</i> auf <i>Transgene Silencing</i>	78
4.6	Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteine	79
4.7	Einfluss von <i>SUVH2</i> auf die Expression der Resistenzgene	81
4.8	Interaktion zwischen <i>SUVH2</i> und dem Virus <i>TuMV</i>	83
4.9	Zusammenfassung	85
5.	Anhang	87
5.1	Primerliste	87
5.2.	Sequenzen	90
5.2.1	Sequenz und Proteindomänen von OsSET1	90
5.2.2	Sequenz und Proteindomänen von At <i>SUVH2</i>	91
5.3.	Liste der Insertionsorte für die Linien 35S*:: <i>mycSUVH2</i>	91
5.4	Reduzierte Transposon Expression in der Linie 35S*:: <i>mycSUVH2#5</i>	92
5.5	Mutanten im <i>mycSUVH2</i>	93

5.6	Expressionveränderungen in <i>35S*::mycSUVH2#5</i> Überexpressionspflanzen	94
5.6.1	Zusammenfassung der reprimierten Gene in <i>35S*::mycSUVH2#5</i>	94
5.6.2	Änderung der Expression einiger Transposons	94
5.6.3	Änderung der Expression einiger an der Pathogenantwort beteiligter Gene	95
6.	Literatur	96

1. Einleitung

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) gehört zu der Familie der Brassicaceae. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften wurde *Arabidopsis thaliana* als genetisches Studienobjekt vorgeschlagen (Meyerowitz und Pruitt, 1986). Neben ihrer geringen Wuchshöhe und einer kurzen Generationszeit besitzt *Arabidopsis* ein relativ kleines Genom von ca. 100 Mbp. Das Genom ist arm an dispers verteilten, repetitiven Sequenzen. Der haploide Satz besteht aus fünf Chromosomen, (Redei, 1970; Meyerowitz, 1989).

Der Zellkern von *Arabidopsis* präsentiert, wie alle eukaryotischen Kerne, eine komplexe Anordnung von heterochromatischen und euchromatischen Domänen (Fransz et al., 2003). Der Begriff Heterochromatin steht für konstitutives und fakultatives Chromatin. Es sind Chromosomensegmente, die während der Interphase kondensiert bleiben. Sie sind in der zytologischen DAPI-Färbung als helle Spots sichtbar. Molekular beinhalten sie unter anderem Tandem *Repeats*. Biochemisch sind es DNA-Proteinkomplexe, welche insensitive gegen eine DNase I Behandlung sind. Heterochromatin ist transkriptionell inaktiv, spät replizierend und es weist eine geringe meiotische Rekombination auf. Heterochromatin findet man in den Zentromerregionen, den Telomerregionen und den NOR-Bereichen (*Nucleolus Organizing Region*). In diesen Regionen sind die Zytosine des CpG Motivs zu ca. 80% methyliert (Finnegan et al., 1998; Nagaki et al., 2003).

Die Zytosin-Methylierung hat Einfluss auf die transkriptionelle und transpositionelle Aktivität der DNA-Transposons ((Jiang et al., 2003; Kato et al., 2004). In *Arabidopsis thaliana* sind sie stark methyliert und transkriptionell inaktiv (TGS *Transcriptional Gene Silencing*). Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Faktor des TGS-Effektes in *Arabidopsis* (Richards und Elgin, 2002). Mittels der benachbarten Sequenzen des Zytosins werden die DNA-Methylierungen in symmetrische und asymmetrische Motive unterteilt. Als symmetrische Methylierung werden die Sequenzmotive CpG und CpNpG bezeichnet (Lindroth et al., 2001, Jackson et al., 2002). In den letzten Jahren wurden die Mechanismen intensiv untersucht, welche zur Aktivierung oder zur Stilllegung von Genen führt. Für die Identifizierung von DNA- bzw. Histonmethyltransferasen, welche Einfluss auf den TGS haben, mussten Hilfssysteme genutzt werden. Drei verwendete Systeme werden in folge genauer erläutert.

1.1 Identifizierungssysteme für TGS-Suppressoren in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* können Suppressormutanten für TGS mit Hilfe der T-DNA- bzw. der EMS-Mutagenese identifiziert werden. Ein transgenes *Silencing*-System wurde von Mittelsten Scheid *et al.* (1998) etabliert. Als Reportersystem diente die *lineA* (*Arabidopsis thaliana* Ökotyp Zürich), welche 15 T-DNA-Kopien mit dem Selektionsmarker Hygromycin enthält (Probst *et al.*, 2003). Durch die repetitive Anordnung der T-DNA geht die transkriptionelle Aktivität des Hygromycins in den Nachkommen verloren, da diese hochmethyliert vorliegen (Mittelsten Scheid *et al.*, 1996). In diesem Essay konnten, mittels EMS, acht Mutanten *som1-som8* (*som* für *somniferous*) isoliert werden, die eine Reaktivierung der Hygromycin-Resistenz aufwiesen.

Im gleichem System wurde mittels der insertionellen T-DNA-Mutagenese die TGS-Suppressor-Mutante *mom1* isoliert (*mom* für *Morpheus´molecule*, Amedeo *et al.*, 2000). Diese Mutante führt zur Reaktivierung von stillgelegten Sequenzen, wie TSI (*Transcriptionally Silent Information*) und den perizentrischen *Repeats* (Tariq *et al.*, 2002).

Ein sehr sensitives Selektionssystem für die Isolierung von TGS-Suppressoren wurde von I. Hofmann unter Verwendung des Reportergens *LUZIFERASE* etabliert (Hofmann, 2004). Das Gen *LUZIFERASE* wurde mehrfach und gleichgerichtet in die T-DNA integriert und in *Arabidopsis thaliana Columbia* transformiert. Ausgehend von vollständig inaktivierten *LUZIFERASE*-Linien konnten nach EMS-Behandlung Mutanten isoliert werden, in welchen die *LUZIFERASE* reaktiviert vorlag. Mit diesem System gelang es, Allele für die Gene *ddm1*, *met1* und *cmt3* zu isolieren (Hofmann, 2004).

Das letzte System, welches vorgestellt werden soll, sind die *clark kent* (*clk*)-Mutanten. Die *clark kent*-Mutanten sind epigenetische Allele (Epimutanten) des *Arabidopsis* SUPERMAN (*SUP*)-Locus. Die *SUP*-Gene sind hypermethyliert und somit inaktiviert (Jacobson and Meyerowitz, 1997). Das spontane Auftreten von *clk*-Mutanten wurde in *MET1-Antisense*-Linien, sowie in *met1*- und *ddm1*-Mutanten beobachtet. Die Ursache ist noch nicht bekannt, da die DNA in den genannten Mutanten hypomethyliert vorliegt (Lindroth *et al.*, 2001). Phänotypisch sind die rezessiven *clk*-Mutanten durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet (Jacobson und Meyerowitz, 1997). Der Mutantenphänotyp ist nicht stabil, deshalb wurde eine zusätzliche Kopie des *SUP*-Locus eingebracht (Lindroth *et al.*, 2001). Das stabilisierte *clark kent*-Allel (*clk-st*) wurde in einer EMS-Mutagenese für die Isolation von Suppressoren mit reaktivierter *SUP*-Genexpression genutzt.

Es konnten die Gene *CMT3* (*CHROMOMETHYLASE 3*, Lindroth et al., 2001), *KYP* (*KRYPTONITE* oder *SUVH4*, Jackson et al., 2002) und *AGO4* (*ARGONAUTE 4*, Zilberman et al., 2003) identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Systeme wurden DNA- und Histon-modifizierende Proteine gefunden, die infolge beschrieben werden.

1.2. DNA modifizierende Gene mit Einfluss auf den TGS in *Arabidopsis thaliana*

Das Protein DDM1 zeigt eine Ähnlichkeit zur SNF2-Familie aus Hefe (Finnegan et al., 1998; Smith et al., 2003). Es ist eine DNA-abhängige ATPase und kodiert ein SWI2/SNF2-ähnliches Protein (Jeddeloh et al., 1999, Smith et al., 2003). Der SWI2/SNF2-Komplex spielt eine Rolle beim *mating type switch* (*SWI* für *switch-independent*) und ist involviert in die transkriptionelle Regulation der Glukose-Repression (*SNF* für *sucrose non-fermenting*; Winston und Carlson, 1992). Die *ddm1*-Mutanten zeigen eine DNA-Hypomethylierung (Kakutani et al., 1999, Brzeski et al., 2003), eine Dekondensation der Chromozentren (Grendel et al., 2002) und eine Reaktivierung der Expression des in *Arabidopsis thaliana* stark methylierten und stillgelegten Gens *PAI2* (kodiert eine Phospho-ribosylanthranilat Isomerase; Jeddeloh et al., 1998). Es erfolgt in *ddm1*-Mutanten eine Reaktivierung der Expression des DNA-Transposons *CACTA* (Kato et al., 2004), sowie die Reaktivierung der Expression der Retrotransposons *ATHILA* und *TA3* (Kakutani et al., 1995; Xiao et al., 2003; Kato et al., 2003). Für die *ddm1* Mutanten wurde eine reduzierte Methylierung am Histon H3K9 und eine erhöhte Methylierung am Histon H3K4 gezeigt (Gendrel et al., 2002; Chang et al., 2005). Die *ddm1*-Pflanzen wiesen nur geringe oder keine morphologischen Abnormalitäten auf (Vongs et al., 1993).

Mit Hilfe der aufgeführten Selektionssysteme konnten zwei DNA-Methyltransferasen identifiziert werden. Das Protein MET1 (Methyltransferase 1) zeigt eine hohe Homologie zu der Methyltransferase DNMT1 (Finnegan und Dennis, 1993). In Säugetieren wurde nachgewiesen, dass nach der Replikation die hemimethylierten DNA-Sequenzen ein Substrat für die DNA-Methyltransferase DNMT1 sind und dass die Zytosine im symmetrischen Motiv CpG des neu synthetisierten DNA-Stranges methyliert werden (Bestor et al., 1988).

In *Arabidopsis met1*-Mutanten wurden vor allem eine Reduktion der Methylierung im Motiv CpG nachgewiesen. Die Mutanten bilden zahlreiche phänotypische Veränderungen aus, die von einer Generation zur nächsten Generation verstärkt werden (Finnegan et al., 1996).

Die zweite identifizierte DNA-Methyltransferase ist das Protein CMT3 (CHROMO-METHYLASE 3), welche neben der Methyltransferase-Domäne eine Chromo-Domäne enthält (Henikoff und Comai 1998). In der *cmt3*-Mutante ist die Methylierung im Motiv CpNpG und in asymmetrischen Motiven an bestimmten Loci reduziert (Bartee et al., 2001). Diese Reduktion der DNA-Methylierung betrifft das Transposon *TA3* und den stillgelegten *SUPERMAN*-Locus (Okamoto et al., 2001). Des Weiteren ist eine Bindung der Chromodomäne von CMT3 mit den methylierten Histonpositionen H3K9 und H3K27 nachgewiesen wurden (Lindroth et al., 2004). Die Chromo-Domäne wurde zuerst in den *Drosophila* Proteinen HP1 und Polycomb (PC) identifiziert. Für das HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1) konnte eine Bindung der Chromo-Domäne an das Histon H3 für Modifikationen Di- und Trimethyl K9 nachgewiesen werden (Bannister et al., 2001; Fischle et al., 2003), während die Chromo-Domäne von PC an methyliertem Histon H3K27 bindet (Paro et al., 1996, Jackson et al., 2002).

Die Proteine *DRM1* und *DRM2* (*domains rearranged methylase*) stellen eine weitere Gruppe von Methyltransferasen dar. Ihre katalytische Domäne zeigt eine sequenzielle Homologie zur Familie der Methyltransferasen *DNMT3* (Cao et al., 2000). In *Arabidopsis* sind *DRM1* und *DRM2* für die initiale Etablierung der DNA-Methylierung in symmetrischen und asymmetrischen Sequenzmotiven verantwortlich, sowie für die Erhaltung der asymmetrischen Methylierung [Cao et al., 2002(a); Cao et al., 2002(b)]. Die *DRM* Proteine sind zur Etablierung nicht aber zur Aufrechterhaltung von *Silencing* erforderlich.

In *met1*- und *cmt3*-Mutanten werden im Gegensatz dazu inaktivierte Sequenzen durch eine Reduktion der DNA Methylierung an spezifischen Loci reaktiviert. Des Weiteren wurde für verschiedene *TGS*-Mutanten eine Mobilisierung von Transposons gezeigt, wenn die DNA-Methylierung reduziert ist (Singer et al., 2001; Miura et al., 2001; Chan et al., 2005). Neben der DNA-Methylierung besitzt die Histonmethylierung einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Genen. In der EMS-Mutagenese für die Isolation von Suppressoren des TGS Effektes mit reaktiverter *SUP*-Genexpression konnten neben DNA-Methyltransferasen auch Histon modifizierende Proteine, wie KRYPTONITE identifiziert werden.

1.3 Histon modifizierende Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Das Protein KYP (KRYPTONITE oder SUVH4) gehört zu den SU(VAR)3-9-homologen Proteinen. KYP war die erste identifizierte HMTase aus *Arabidopsis* (Jackson et al., 2002).

Es methyliert das Histon H3 an der Position Lysin 9. In der *kyp* Mutante ist die DNA-Methylierung am hochmethylierten *clark kent* Allel des SUPERMAN Locus reduziert, speziell im symmetrischen Motiv CpNpG.

In der Mutante *kyp* ist die normale Expression der *SUP*-Gene und der normale Blütenphänotyp wiederhergestellt (Johnson et al., 2002). Des Weiteren ist KYP an der Aufrechterhaltung, nicht aber an der Etablierung der Zytosin-Methylierung beteiligt (Malagnac et al., 2002). Das Protein KYP oder SUVH4 weist eine starke Homologie zur SET-Domäne des Proteins SU(VAR)3-9 aus *Drosophila melanogaster* auf. In *Arabidopsis* wurden insgesamt 15 SU(VAR)3-9 homologe Proteine gefunden, welche in zwei Gruppen gegliedert werden können. Die SUVH-Gruppe enthält 10 Proteine mit einer YDG-Domäne im N-Terminus. Die fünf Proteine der SUVR-Gruppe enthalten im N-Terminus keine YDG-Domäne (Baumbusch et al., 2001).

Ihre SET-Domänen werden von zwei Zystein-reichen-Regionen begrenzt, der pre- und post-SET-Domäne bzw. C- und N-SET-Domäne. Die C-SET-Domäne ist wichtig für die enzymatische Aktivität von HMTasen (Marmorstein, 2003). Für die SU(VAR)3-9 homologe SET-Domäne konnte eine Histon Methyltransferase Aktivität an den Positionen H3K9, H3K27 und H4K20 nachgewiesen werden. Diese HMTase Aktivitäten zeigen auch andere SU(VAR)3-9 orthologe Proteine in verschiedenen Organismen, wie zum Beispiel das Säugerprotein SUV39 (Rea et al., 2000) und das Hefeprotein Clr4p (Nakayama et al., 2001). Das *Drosophila* Protein SU(VAR)3-9 wurde als Suppressor des PEV-Effektes identifiziert (Tschiersch et al., 1994) und es kodiert eine Histon H3K9 spezifische HMTase (Schotta et al., 2002).

1.4 SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis thaliana*

In Sequenzanalysen konnte nur für das Gen *SUVH4* eine Exon/Intron-Struktur mit 4 Intronen nachgewiesen werden (Baumbusch et al., 2001). Die anderen *SUVH*-Gene enthalten keine Intronen innerhalb ihres ORF's. Es ist möglich, dass das Gen *SUVH4* bzw. *KRYPTONITE* das ursprüngliche Gen der SU(VAR)3-9 homologen Gruppe in *Arabidopsis* darstellt. Die anderen *SUVH*-Gene könnten durch Retrotranspositionen entstanden sein. Diese Retrotransposition kommt häufig bei Proteinen vor, die an der mRNA Translation beteiligt sind, oder es sind Gene mit nuklearer Funktion betroffen.

Diese *RPC's* (*retroposed copies*) sind entweder funktionelle Gene oder es handelt sich um Pseudogene ohne Funktion. So wurden 219 HMG-Proteine im Menschen identifiziert, die durch Retrotransposition entstanden sind (Strichman-Almashanu et al., 2003).

Das HMG ist ein Kernprotein, welches an die kleine Furche der DNA bindet und somit einen Effekt auf die DNA-Aktivität hinsichtlich ihrer Replikation, Transkription und ihrer Kompaktheit hat (Churchill et al., 1991; Claus et al., 1994). Der Mechanismus der Retrotransposition bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die große Anzahl von SET-Domänen Proteinen in *Arabidopsis*.

Im Gen *SUVH6* wurden keine Intronen lokalisiert. Für dieses Protein konnte ebenfalls eine HMTase-Aktivität für Histon H3K9 nachgewiesen werden (Jackson et al., 2004). Für die Gene *SUVH2* und *SUVH3* konnten im nicht kodierenden Bereich Intronen identifiziert werden (Baumbusch et al., 2001). Die Proteine *SUVH3*, *SUVH7* und *SUVH8* enthalten im N-Terminus zusätzliche AT-Hook-Motive, die in der Lage sind, an der DNA zubinden (Churchill und Travers, 1991). Für die Proteine *SUVH3* und *SUVH7* konnte jeweils ein AT-Hook-Motiv und für das Protein *SUVH8* zwei Motive lokalisiert werden. Die AT-Hook-Motive sind Bestandteil der HMG-Y/I-Proteine.

Das DNA-bindende AT-Hook-Motiv konnte auch in nicht HMG-Proteinen identifiziert werden. So besitzt das *Drosophila* Protein *ASH1* neben einem AT-Hook-Motiv auch eine SET-Domäne und einen PHD-Finger (*Absent, Small or Homeotic Discs*; Tripoulas et al., 1996). Nach Tripoulas et al. (1996) ist für die Bindung des Proteins *ASH1* an die DNA das AT-Hook-Motiv von Bedeutung. Die SET-Domäne des Proteins *ASH1* kodiert eine aktive HMTase, welche die euchromatischen Histonmodifikationen an den Histonen H3K4, H3K9 und H4K20 katalysiert (Byrd et al., 2003). Das Trithorax-Gruppen Protein *ASH1* vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des sonst stillgelegten Gens *Ubx* (Ultrabithorax) in *Drosophila* und die Deplatzierung der Proteine *HP1* und *Pc*, die normalerweise an den Promotor von *Ubx* binden und ihn reprimieren (Beisel et al., 2002). Orthologe *ASH1*-Proteine wurden in einer Vielzahl tierischer und pflanzlicher Organismen identifiziert. So enthält *Arabidopsis* sieben *ASH*-Proteine, davon gehören vier Proteine zur *ASH1*-homologen Gruppe und drei Proteine zählen zu der *ASH1*-verwandten Gruppe (Baumbusch et al., 2001). Die SET-Domäne befindet sich nicht im C-Terminus des Proteins, sondern ist in der Mitte des Proteins lokalisiert.

Die konservierte SET-Domäne ist nicht nur in den Proteinen SU(VAR)3-9 und ASH1 enthalten, sondern auch in den *Drosophila* Proteinen TRITHORAX und E(Z).

Die Gruppe der TRITHORAX Proteine in *Arabidopsis* umfasst insgesamt 12 Proteine. Sie zeigen eine Homologie zur SET-Domäne der TRITHORAX Proteine aus verschiedenen Organismen.

In *Arabidopsis* wurden sieben verwandte und fünf homologe TRITHORAX Proteine identifiziert. Über die Funktion dieser Gruppe ist mit Ausnahme des Proteins ATX1 noch nichts bekannt. Das *Arabidopsis* Protein ATX1 reguliert die Entwicklung der Blütenorgane und besitzt eine Histon H3K4 Methyltransferaseaktivität (Alvarez-Venegas et al, 2003). In den *atx1*-Mutanten sind die homeotischen Gene *API*, *AP2*, *AG* und im geringeren Maße *PI* und *AP3* dereguliert. *ATX1* wird zur Aufrechterhaltung des normalen Expressionsniveaus dieser Gene benötigt. Der aktivierende Effekt von ATX1 ist Gen spezifisch (Alvarez-Venegas et al, 2005). Es ist ein epigenetischer Regulator mit Histon H3K4 Methyltransferaseaktivität, dessen SET-Domäne im Gegensatz zum *Drosophila* TRX Protein allein in der Lage ist, die Position Lysin 4 zu methylieren (Alvarez-Venegas et al, 2003; Alvarez-Venegas et al, 2005).

Für das humane TRX-homologe Protein MLL/ALL konnte ebenfalls eine Histon H3K4 HMTase-Aktivität nachgewiesen werden (Milne et al., 2002).

Eine weitere Gruppe von SET-Domänen Proteinen stellen die E(Z)-Homologen dar. Das *Drosophila* Protein E(Z) gehört zu den Polycomb-Gruppen Genen Pc(G). Es konnte eine Histon-Methyltransferaseaktivität für Histon H3 an der Position K27 festgestellt werden (Ebert et al., 2004). Das Protein E(Z) ist wichtig für Etablierung und Aufrechterhaltung der Repression einiger homeotischer Gene (*Ubx*, *Antennapedia*, *Bithorax*) in *Drosophila melanogaster* (Muller et al., 2002). E(Z) ist eine Untereinheit des Polycomb-Komplexes ESC-E(Z) [ESC-Extra Sex Comb].

Der Verlust des funktionellen Proteins E(Z) hat einen Verlust der Lokalisierung des PcG-Komplexes an den Polytänschromosomen zur Folge, da dieser Komplex nicht mehr in der Lage ist mit den *Polycomb Repressive Complex 1* oder *2* zu interagieren (Czermin et al., 2002). Des weiteren wird die Bindung von POLYCOMB (PC) an einen PRE-Komplex (*Polycomb response element*) reduziert, das führt zu einer Expression der stillgelegten Gene (Lund et al., 2004). Das Protein POLYCOMB enthält eine Chromo-Domäne, diese interagiert mit trimethylierten Histon H3 Lysin 27 und mit dem Aminosäuremotiv ARKS (Fischle et al., 2003; Min et al., 2003).

Durch eine Dimerisierung der Chromo-Domänen des Proteins POLYCOMB erfolgt eine zusätzliche Erkennungsspezifität (Min et al., 2003). Das Protein E(Z) methyliert das Histon H3 an der Position 27, während POLYCOMB an methylierten H3K27 bindet.

Die ersten identifizierten SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis* gehörten zu der ENHANCER OF ZESTE [E(Z)]-Gruppe. Zu dieser Gruppe gehören die Proteine CLF, MEA und SWN (EZA1).

Das erste identifizierte E(Z)-homologe Protein CLF wurde von Goodrich et al. (1997) als ein Repressor des homeotischen Blütengens *AGAMOUS* (*AG*) beschrieben. In *clf*-Mutanten wird *AG* in Blättern und im späten Entwicklungsstadium der Blütenknospe expremiert. Das Protein SWN (Chanvivattana et al., 2004) weist eine starke Ähnlichkeit zu CLF auf und handelt teilweise wie CLF. Für CLF und SWN konnte eine Histon Methyltransferase Aktivität für das Histon H3K27 anhand von *clf/swm*-Doppelmutanten nachgewiesen werden (Cao et al., 2004; Lindroth et al., 2004).

MEDEA (MEA; Grossniklaus et al., 1998; Kinoshita et al., 1999; Autran et al., 2005) ist ein Repressor der Genexpression und der Endospermentwicklung. Es wird in den sich entwickelten femalen Gametophyten und im Endosperm expremiert und induziert *Imprinting* für die paternalen Gene. MEDEA reguliert die Samenentwicklung mittels des MADS-Box Gens *PHERES1* (Autran et al., 2005). Die Aktivierung des maternalen *MEDEA*-Allels benötigt die Funktion von DEMETER, welches eine pflanzliche DNA-Glycosylase ist (Berger, 2003; Autran et al., 2005). Neben DEMETER wurde auch das Protein ROS1 als DNA-Demethylase beschrieben. In beiden Mutanten konnte eine erhöhte DNA-Methylierung nachgewiesen werden (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002).

Arabidopsis PcG-Gene kontrollieren die transkriptionelle Repression von Entwicklungsgenen im Euchromatin, nicht aber die Methylierung des Histons H3K27. Zusammenfassend modifiziert E(Z) das Chromatin dahingehend, dass es für eine transkriptionelle Repression der Zielgene sorgt, während die TrxG eine Aktivierung der Zielgene veranlasst. Für die Methylierung der Histone an den Lysinpositionen ist die SET-Domäne erforderlich (Marmorstein, 2003; Xiao et al., 2003; Bottomley, 2004).

1.5 Die Rolle der Histon-Modifikationen in Eukaryoten

Die Histon-Methylierung spielt neben der DNA-Methylierung eine bedeutende Rolle in der Genregulation.

Die Histon-Methylierung H3K9, H3K27 und H4K20 sind ein spezifischer epigenetischer Marker für stillgelegte Chromatinbereiche, während die Methylierung am Histon 3 in den Positionen K4, K36 und K79 an aktive Bereiche bindet (Fischle et al., 2003; Lachner et al., 2003). Durch unterschiedliche Methylierungsgrade, wie Mono-, Di- und Tri-Methylierung sind weitere Feinregulierungen möglich (Breiling et al., 2002). In *Drosophila* sind die Histon-Modifikationen H3 Mono-, Di-, Trimethyl-K9 und -K27 sowie die Modifikation Trimethyl-H4K20 spezifisch für Heterochromatin (Ebert et al., 2004).

In *Arabidopsis* sind die Histon-Modifikationen H3 Mono-, Dimethyl-K9 und -K27 sowie monomethyl-H4K20 mit Heterochromatin assoziiert. Die Histon-Modifikationen Trimethyl-H3K9, Trimethyl-H3K27, Di- und Trimethyl-H4K20 wurden dagegen in euchromatischen Bereichen lokalisiert (Fischer, 2005; Naumann et al., 2005).

Neben dem Grad der DNA-Methylierung sind diese Histon-Modifikationen die Grundlage des epigenetischen Histonkods für die transkriptionelle Aktivität und Aufrechterhaltung des "on" bzw. "off" Zustandes der DNA.

Des Weiteren ist nicht nur die Methylierung der Lysine möglich, sondern es erfolgt auch die Methylierung der Arginine. Für Arginin-Histonmethyltransferasen (HRMT) konnten keine einheitlichen Domänen identifiziert werden, sie sind hauptsächlich transkriptionelle Koaktivatoren (Bauer et al., 2002).

Die *Posttranslationalen* Modifikationen der Histone sind reversible Prozesse, so erfolgt die Abspaltung der Methylgruppen durch Demethylasen (HDM). Eine Histondemethylase ist das erst kürzlich entdeckte Protein LSD1 (*Lysine-specific histone demethylase 1*), welches spezifisch das Histon H3 an der Position K4 demethyliert. LSD1 besitzt eine C-terminale FLAVIN-Domäne, welche eine Homologie zu den Aminoxydasen zeigt (Shi et al., 2004; Forneris et al., 2005).

Eine weitere Modifizierungsmöglichkeit der Histone ist die Azetylierung und Deazetylierung. Diese wird moduliert durch Histonazetyltransferasen und Deazetylasen (Changhe et al., 2005). Die reversible Azetylierung ist korreliert mit Genaktivität in verschiedenen Organismen. Die Histonazetyltransferasen (HAT) katalysieren den Transfer eines Azetylrestes von azetyl-CoA zu der Aminogruppe des Lysins, während Histondeazetylasen (HDAC) diese Modifikation umkehren. In *Arabidopsis* wurden 18 putative Histondeazetylasen und 12 putative Histonazetylasen identifiziert (Pandey et al., 2002). Eukaryotische HDAC's können in drei Klassen gruppiert werden.

Die Unterteilung basiert auf ihre Homologie zu den Hefe Histonazetyltransferasen REDUCED POTASSIUM DEPENDENCY3 (RPD3), HISTONE DEACETYLASE1 (HDA1) und SIRTUIN2 (Pandey et al., 2002; Yang and Seto, 2003).

Die Aktivierung des Gens Plastocyanin *PetE* aus der Erbse ist verbunden mit einer Gewebe abhängigen Hyperazetylierung des Histons H4 in der Enhancer/Promotor-Region (Chua et al., 2001). Studien in Hefe zeigten, dass die Promotoren aktivierter Gene mehr azetyliertes Histon H3 und H4 aufwiesen (Bernstein et al., 2002; Robyr et al., 2002). Die Reduzierung von *AtRPD3A* (*AtHDI1*) in *Arabidopsis* führt zu einer Fehlbildung der Blüte und zur Ausbildung von Luftrosetten (Wu et al., 2000).

Der *AtRPD3A* Phänotyp ist assoziiert mit einer Hyperazetylierung des Histons H4 und führt zu einer ektopischen Expression von Regulatoren der Blütengene. Das Protein AtHDA6 (*AtRPD3B*) spielt eine Rolle beim TGS, dass konnte in der HDA6-Mutante *axe1* gezeigt werden. In dieser Linie wurde eine zunehmende Expression des Auxin-Response Transgens, nicht aber der endogenen Auxin-Response Gene nachgewiesen (Murfett et al., 2001).

Weitere Histonmodifikationen sind Phosphorylierung der Aminosäure Serin und Ubiquitinierung der Aminosäure Lysin. Die Phosphorylierung wird durch spezifische Kinasen vermittelt. Die Histon H3 Phosphorylierung ist am Serin 10 assoziiert mit transkriptionell aktivem Chromatinbereichen (Nowak et al., 2004). Eine gut untersuchte Gruppe von Serin/Threonin Kinasen ist die Familie der Aurora-Kinasen. In *Arabidopsis* wurden kürzlich drei Aurora-Kinasen (*AtAUR1*, *AtAUR2* und *AtAUR3*; Kawabe et al., 2005) identifiziert.

Die Ubiquitinierung ist eine weitere reversible Modifizierung der Histon Lysine, hier wird das Ubiquitin über einer Peptidbindung an das Lysin gebunden. In *Tetrahymena* hat die Ubiquitinierung von Histone 2A eine Repression zur Folge (Moore et al., 2002). In Hefe vermittelt das E2-Ubiquitin-konjugierte Enzym UBC2/RAD6 die Ubiquitinierung des Histons H2B an der Position 123. Für eine *rad6*-Mutante und eine Histon H2B (K123R)-Mutation, in welcher das Histon H2B ubiquitiniert ist, konnten Defekte in der Sporulation und mitotischem Wachstum gezeigt werden (Robzyk et al., 2000). Das *Arabidopsis* homologe Protein AtUBC2 ist in der Lage, die Hefe *rad6*-Mutante zu komplementieren (Zwirn et al., 1997).

1.6 Ziele der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung und die funktionelle Analyse des Gens *AtSUVH2* in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia.

Zunächst wurde die Expression von *SUVH2* in der Zelle und in der Pflanze untersucht. Es erfolgte die Lokalisierung des Proteins in den Kompartimenten von Zwiebelhaut-epidermiszellen. Des weiteren wurde die Expression von *SUVH2* in verschiedenen Organen der Pflanze *Arabidopsis* untersucht.

In vivo sollten die Effekte von *SUVH2* in *Arabidopsis* analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden transgene Linien verwendet. Es erfolgte eine Analyse des Phänotyps in den transgenen Linien. Des weiteren wurden die dosisabhängigen Effekte von *SUVH2* auf die genomweite Expression untersucht. Es wurden vor allen Veränderungen der Transkriptmengen von Transposons und von Genen der Pathogenabwehr untersucht.

Eine funktionelle Charakterisierung der YDG- und der SET-Domäne des Proteins *SUVH2* erfolgte mittels EMS-Mutagenese. Für diese Analyse wurde eine Überexpressionslinie verwendet.

Des weiteren erfolgte eine Untersuchung hinsichtlich der Interaktion von *SUVH2* mit bereits bekannten DNA- und Histon-modifizierenden Proteinen. Für diese Analyse wurde eine *SUVH2* Überexpressionslinie mit der bekannten Mutantenlinie *ddm1-2* gekreuzt.

Weiterhin wurde der Einfluss von *SUVH2* auf TGS getestet. Als Reporterlinie wurde eine partiell stillgelegte LUC-Linie verwendet und diese mit *SUVH2* Überexpressionslinien gekreuzt. In ihren Nachkommen wurde der Einfluss von *SUVH2* auf die Aktivität der Luziferase untersucht.

Eine weitere Untersuchung dient der Klärung der Reaktion von *SUVH2* auf biotischen Stress. Für diesen Test wurden *Arabidopsis* Linien mit dem RNA-Potyvirus TuMV (*Turnip Mosaic Virus*) infiziert. Es erfolgte eine Analyse der Expression der Su(var)3-9 homologen Gene *SUVH1* bis *SUVH9*.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme / Bakterienanzucht und -behandlung

2.1.1 verwendete Bakterien

In der Tabelle sind alle verwendeten *E.coli*-Stämme angegeben. Diese Stämme wurden von den Firmen Stratagene und Invitrogen erworben. Für alle Pflanzentransformationen wurde der *Agrobacterium tumefaciens*- Stamm GV3101 (Koncz et al., 1986) verwendet.

Bakterien	Genotyp	Verwendung
XL1-Blue MRF'	endA1, supE44, recA, thi-1, gyrA96, Δ(mcrA)183 relA1, Δ(mcrCb-hsdSMR-mrr)lac[F'proAB, lacIqZc ΔM15, Tn10]	Wirt für αZapI und ExAssist Phage
SOLR	e14-(mcrA, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, Su αR[F'proAB, lacq ZΔM15] recB, recJ, umuC:TN5 uvrC, lac, gyrA96, relA, thi-1, endA1	Infektion mit Phagemid
DH5 □	F-, endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA lacZ Δ M15	Wirt für pBs

2.1.2 Verwendete cDNA-Bibliotheken

Für die Isolierung des Gens *OsSET1* wurden die Bibliotheken der λ-Phagen gt22 und ZapII verwendet. Für die λ-Phagen gt22 Bibliothek wurde RNA aus *Oryza sativa* (Kallus) isoliert. Die Fragmente variierten zwischen 1,2 kp und 1,8 kp.

Die λ-Phagen ZapII Bibliothek wurde aus RNA junger Blätter von *Oryza IR36* isoliert. Die Fragmentgrößen variierten zwischen 1,0 kp und 3,3 kp.

2.1.3 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in/auf LB-Medium/Agar. Sie wurden über Nacht bei 37°C unter Zusatz von 100µg/ml Amp. oder 50µg/ml Kan. [Ampicillin (ROTH); Kanamycin (DIAGONAL)] inkubiert.

Die Flüssigkultur wurde mit 180 rpm geschüttelt. Eine Selektion auf β -Galactosidase erfolgte mit X-Gal (20mg/l, ROTH).

2.1.4 Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien

Für die Präparation kompetenter Agrobakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 100µg/ml Rifampicin, 10µg/ml Gentamycin mit einer Übernachtskultur überimpft. Die Zellen wurden für 10 min bei 4.000x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml 0.5x MS-Salzlösung resuspendiert und anschließend als 200 µl Aliquots eingefroren. Die Transformation (Höfgen & Willmitzer, 1988) kompetenter *Agrobakterien* erfolgte nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenter *Agrobacterium*-Suspension durch Inkubation auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C für je 5 Minuten. Nachfolgend wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und die Zellen für 4 Stunden bei 30°C, 150 rpm in Dunkelheit geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde schließlich auf LB- Agarplatten mit 100 µg/ml Kanamycin, Rifampicin und 10µg/ml Gentamycin plattiert und bei 30°C für 2 Tage in Dunkelheit inkubiert.

Die Anzucht des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101 pMP90 (Koncz and Schell, 1986) erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Platten bei 30°C unter Zusatz von 100 µg/ml Rifampicin (DUCHEFA), 10µg/ml Gentamycin (DUCHEFA) und gegebenenfalls 50 µg/ml Kanamycin (DIAGONAL).

2.2 *Arabidopsis thaliana*

2.2.1 Material und Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde das Modellsystem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia verwendet. Das Genom ist vollständig durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt sequenziert (*Arabidopsis Genom Initiative*, 2000). Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf einem Gemisch aus 3 Teilen Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) und 1 Teil Vermiculite (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt). Des weiteren wurden die SALK-Linien *suvh1* (N003675), *suvh2* (N079574), die Linie *35S::LUC2* (Hofmann, 2004) und die *ddm1-2* (Vongs et al., 1993) verwendet.

Für die Anzucht von Arabidopsispflanzen wurden die Samen für 10 Minuten in einer Natriumhypochlorit-Lösung (ca. 5 % aktives Chlor, 0,15 % Tween® 20) inkubiert. Nach Entnahme der Lösung wurden die Samen dreimal mit bidest. sterilem Wasser gewaschen.

Für die Verteilung der Samen auf Agarplatten [500ml: 1,0 x MS-Salze (DUCHEFA, 2.3g); 25g Saccharose; 6 g Agar-Select (GIBCO BRL); 50 µg/ml Kanamycin (DIAGONAL) oder Hygromycin (DUCHEFA)] wurden diese mit Hilfe von sterilem Wasser auf den Nähragar aufgebracht. Die sterilisierten Samen wurden auf Agarplatten mit 50µg/ml Kanamycin oder 50µg/ml Hygromycin gegeben. Die Keimung der Samen erfolgte für sieben bis zehn Tage unter Langtag-Bedingungen. Die Kanamycin-resistenten Samen wurden zur weiteren Anzucht auf Erde umgesetzt.

Die Kanamycin oder Hygromycin-Selektion in folgenden Generationen erfolgte nach der gleichen Methode. Hierzu wurden ca. 50 Samen einer transgenen Linie ausplattiert und unter Langtagbedingungen angezogen.

Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia wurde als Wildtyp verwendet. Die Anzucht erfolgte in klimatisierten Phytokammern bei 24°C, 75% Luftfeuchtigkeit und 8h Licht (Kurztagbedingung) für ein vegetatives Wachstum und in Pflanzen-Anzuchtschränken (Percival) bei 24°C, 75% Luftfeuchtigkeit und 16h Licht (Langtagbedingung) für generatives Wachstum. Die Erde bestand aus einem Gemisch Einheitserde und Sand. *Arabidopsis thaliana* wurden für die Transformation und zur Gewinnung von Pflanzenmaterial in Töpfen angezogen. Alle zu untersuchenden Pflanzen wurde in Erde angezogen.

2.2.2 Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen

Arabidopsis-Samen wurden auf einem Festmedium nach Murashige und Skoog (1962) zur Keimung gebracht, dieses enthält 4,4g/l M&S Salz, 10g/l Agar sowie 30g/l Saccharose. Zur Selektion der T-DNA wurden die entsprechenden Antibiotika wie Kanamycin (50mg/l) bzw. Hygromycin (50mg/l, DUCHEFA, Harleem/ Niederlande) zu gegeben. Für die induzierbaren Konstrukte wurde in das Medium zusätzlich 0,01mM Dexamethason (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gegeben. Reissamen wurden auf 2%-igen Select-Agar-Platten unter Wasser ausgelegt und entweder bei 30°C oder bei 37°C 8 Tage lang inkubiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Körner ständig feucht gehalten wurden. Das Wasser wurde täglich gewechselt, um einem Schimmelbewuchs der Platten vorzubeugen.

2.2.3 Transformation in *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Pflanzentransformation erfolgte über Vakuuminfiltration von *Agrobacterium tumefaciens* in *Arabidopsis thaliana* (Bechthold et al., 1993). Hierfür wurden 500 ml LB-Medium (DUCHEFA) mit je 50 µg/ml Kanamycin, 100µg/ml Rifampicin und 10µg/ml Gentamycin mit 1 ml einer Vorkultur von *Agrobakterien* angeimpft und für ca. 24 h bei 28°C und 120 rpm angezogen. Die *Agrobakterien* wurden 10 Minuten bei 4.000x g pelletiert und 100ml Infiltrationsmedium (für 1 Liter: 1,0xMS-Salz einschließlich Vitaminen (4,5g, DUCHEFA); 20g Saccharose; 10µl BEP (1mg/ml im DMSO; SIGMA) resuspendiert. Für die Vakuuminfiltration wurde der Blütenstand der zu infiltrierenden Pflanzen (T0-Generation) in das *Agrobakterien* Infiltrationsmedium getaucht und nachfolgend für 15 Minuten in einem Exsikator einem Vakuum ausgesetzt. Anschließend wurden die Pflanzen mit Wasser abgewaschen und vorsichtig mit Papier abgetrocknet. Zur Regeneration wurden die Pflanzen anschließend für eine Nacht horizontal und abgedeckt an einen dunklen Ort gelagert. Nach drei bis vier Wochen unter Langtag Anzuchtbedingungen konnten die Samen der Pflanzen geerntet werden.

2.2.4 EMS- Mutagenese von Saatgut

Für eine chemische Mutagenese von *Arabidopsis* Samen wurden ca. 10.000 Samen (50 Samen ca. 1 mg) über Nacht in einer 0,1%igen Kaliumchloridlösung vorgequollen und anschließend in einer Lösung von 90 mM Ethylmethansulfonat (EMS; MERCK) in 0,1 M Na-Phosphat pH 5,0 und 5 % DMSO 4 Stunden mutagenisiert.

Anschließend wurden sie 2 mal für 15 Minuten mit einer 100mM Natriumthiosulfatlösung die EMS-Lösung inaktiviert und 2 mal 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Das mutagenisierte Saatgut (M1-Generation) wurde zunächst für eine Woche getrocknet.

Danach erfolgten die Behandlung der Samen und ihre Aussaat auf Selektionsplatten. Die Anzucht erfolgte in Töpfen auf Erde. Die Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* mit EMS erfolgte nach Leyser und Furner (1992).

2.2.5 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Knospen der als weiblicher Kreuzungspartner vorgesehenen Pflanze mit Hilfe einer Pinzette alle Blütenorgane mit Ausnahme des Stempels entfernt.

Eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners wurde mit der Pinzette so am Blütengrund gefaßt, daß sich die Blüte beim Zusammendrücken der Pinzette weit öffnet. Dadurch stehen die Staubgefäße frei nach außen, so dass damit der Stempel des weiblichen Kreuzungspartners bestäubt werden kann. Die Bestäubung der präparierten Stempel wurde zweimal im Abstand von ca. 24 h wiederholt.

2.3 Plasmide und Konstrukte

2.3.1 Verwendete Expressionsvektoren

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pKExtr	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	transient Expression in Zwiebel-epidermiszellen
pKExtr-GFP	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	smRS-GFP(327) über BamHI/SacI in pKExtr cloniert für transient Assay
pKExtr-GUS	Van Den Ackerveken,G. et al., 1996 35*S Promotor Mindrinos,M. et al., 1994	GUS aus pBI221(Clontech) über BamHI/SacI in pKExtr cloniert für transient Assay
pBI1.4tr	pBI121(Clontech)1.4 kb XbaI-HindIII -fragment vom Vektor pKEx4tr einschließlich MCS	Herstellung transgener Pflanzen
pBI1.4tr-myc/His	pBI121(Clontech)1.4 kb XbaI-SacI -fragment vom Vektor pKEx4tr einschließlich MCS, Klonierung 120Bp Fragment (myc/His- Tag von T.Jenuwein über SalI/EcoRI	Herstellung transgener Pflanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Transformationsvektoren basieren auf der Verwendung der aufgeführten Plasmide. Der Promotor 35S* wird konstitutiv expremiert und zeigt eine 40fach geringere Aktivität als der Ausgangspromotor. GVG ist ein Chimärenprotein, das durch Dexamethason aktiviert wird.

Für die Herstellung der Konstrukte wurden Endonukleasen der Firma MBI verwendet. Ihre Klonierung in dem entsprechenden Vektor erfolgte über eine T4- Ligase der Firmen PROMEGA bzw. MBI. Die Vektoren wurden mit folgender Methode in die *E.coli* gebracht. 2 µl Ligationsansatz (ca. 10 ng Vektor-DNA) werden zu ca. 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert. Nach 20 s Hitzeschockbehandlung bei 37°C werden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert.

Nach der Transformation werden 0,6 ml LB- Medium zugegeben und der Transformationsansatz für mindestens 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden kurz zentrifugiert und auf entsprechenden Antibiotika- haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

2.3.2 verwendete Konstrukte

Die verwendeten Konstrukte für Transformation in *Arabidopsis thaliana* und den transienten Expressionsassay in Zwiebelepidermiszellen.

kloniertes Gen (Länge in Bp)	verwendeter Vektor	verwendete Primer, Restriktionsenzyme	Bemerkung, Verwendung
SUVH1 (1-2010)	pKEX4tr-GUS/GFP	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop, Sall	gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH1 (1-2010)	pBI 1.4tr-myc	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop/stop, Sall	Herstellung transgener Linien <i>Arabidopsis thaliana</i>
SUVH1 (1-2010)	pTA7002-EGFP	SUVH1-start, Sall SUVH1-stop, Sall	EGFP-Fusion zur Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> mit induzierbarer Expression
SUVH2 (1-1953)	pKEX4tr-GUS/GFP	SUVH2-start, BamHI SUVH2-stop, BamHI	GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH2 (1-1953)	pBI 1.4tr-myc	SUVH2-start, BamHI SUVH2-stop/stop, BamHI	myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i>
SUVH2 (1-1953)	pTA7002-EGFP	SUVH2-start Xho, XhoI SUVH2-stop Xho, XhoI	Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> mit induzierbarer Expression des Transgens
Clf (1-2709)	pKEX4tr-GUS/GFP	clf-A-Not, NotI clf-B-Not, NotI	gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay
SUVH3	pKEX4tr-GUS/GFP		gesamtes Gen (ORF) als GUS/GFP-Fusion für transienten Assay

2.3.3 Konstruktion des binären Vektors pBI 1.4tr

Für die konstitutive Expression in Arabidopsis wurde ein geeigneter Vektor konstruiert, in welchen die untersuchten Proteine als myc-Fusionsproteine unter Kontrolle des CaMV 35S*-Promotors exprimiert wurden. Der *CaMV 35S**- Promotor (Mindrinos *et al.*, 1994) weist eine 40fach geringere Aktivität im Vergleich zum Ausgangspromotor auf. Ausgangspunkt der Konstruktion des pBI1,4t-myc Vektors war der binäre pBI121 Vektor (Clontech). In diesen wurde ein 1.4 Kb *HindIII/XbaI*- Fragment aus den pKEx4tr-Vektor eingebracht. Dieses beinhaltet eine MCS, den *CaMV-35S**-Promotor und eine Terminatorsequenz der Nopalinsynthetase. Ein Konstrukt, welches eine 3-faches Repeat des *myc*- Gens (erhalten von T.Jenuwein) enthält, wurde über die *EcoRI/SalI*- Schnittstellen in den Vektor ligiert. In den resultierenden binären Vektor wurden die zu analysierenden Gene kloniert.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.4.1 Isolation von Plasmid- DNA nach alkalischer Methode (Birnboim und Doly, 1979)

Eine Kolonie der transformierten *E.coli* wurde von einer Transformationsplatte entnommen und zu 1,8ml LB- Medium (100mg/l Ampicillin) gegeben. Die Kultur wurde für mindestens 6h bei 37°C geschüttelt und danach für 2min in einer Mikrozentrifuge sedimentiert, das Pellet in 0,3ml P1 (50mM Tris-HCl, pH8,0; 10mM EDTA; 100 g/ml RNase A) gelöst und nach Zugabe von 0,3ml P2 (200mM NaOH; 1% SDS) für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,3ml P3 (3M Kaliumazetat pH 5,5) wurde der Ansatz für 20min zentrifugiert. Zum Überstand wurde 1/10Vol 3M NaCl und 0,7Vol Isopropanol gegeben und die Suspension für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen. Nach dem Trocknen erfolgte die Aufnahme in 30µl bidest. Wasser.

2.4.2 Präparative Plasmidisolierung

Zur Plasmid-DNA Isolation wurde der *rapid plasmid purification systems*- Kit der Firma Marligen verwendet. Die zu präparierenden Bakterienklone wurden in einer 2-5 ml LB-Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten, 5000 rpm) wurden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Marligen aufgearbeitet.

Die Aufreinigung der Plasmid- DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule, basierend auf SiO₂. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschriffe wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol entsalzt. Das getrocknete Pellet wird in 50µl Wasser resuspendiert.

2.4.3 Ligation

Für die Gelelution wurde der Kit QIAquick Spin der Firma QIAGEN verwandt. Das Prinzip der Gel Extraktion bzw. PCR Produkt Aufreinigung beruht auf der DNA-Bindung eines mindestens 300bp-Fragmentes an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern. Die Verunreinigungen werden aus der Säule ausgewaschen.

Bei der Gelelution wird die zu isolierende DNA-Bande aus einem 0,8-1,5%igen Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen über eine Säule gereinigt. Anschließend wird die gereinigte DNA mit TE oder H₂O von der Säule eluiert. Die Aufreinigung des PCR- Produktes erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

Zunächst erfolgte eine Restriktion von Insert und Plasmid für mindestens 2h bei 37°C. Für die Restriktion wurden ca. 500ng Insert-DNA oder 100ng Plasmid , 1x Endonukleasepuffer und ca. 1U Endonuklease eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 10µl und wurde mit sterilen bidest. Wasser aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden in einen 1% Agarosegel getrennt und eluiert (QUIAGEN).

Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte über Nacht und wurde in einem Gesamtvolumen von 100µl durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurden 200ng Insert, 20ng Plasmid, 1,5µl Ligationspuffer, 1,0µl Ligase T4 (5U) verwendet. Der Ligationsansatz wurde mindestens für 4h bei 16°C inkubiert.

Die zu etablierenden Überexpressionskonstrukte wurden zuerst in den pGEM-T Vektor eingebracht und sequenziert, anschließend erfolgte die Klonierung in den binären Transformationsvektor pBI1.4tr- myc.

Die Klonierung der Sequenz myc (erhalten von T. Jenuwein) in den pBII.4tr erfolgte über die Restriktionsenzyme *Sall* und *EcoRI*.

Über die mit Hilfe der Primer etablierten Restriktionsschnittstellen konnten die Gene *OsSET1*, *CLF*, *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH3* aus den pGEM-T Vektor ausgeschnitten und in den pEKx4tr-GUS bzw. pEKx4tr-GFP im 5'-Bereich der Reportergene kloniert werden.

In diesem Schritt wurden die zu untersuchenden Gene *OsSET1*, *CLF*, *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH3* mit dem Reporter GUS bzw. GFP fusioniert.

2.4.4 DNA Isolation *Arabidopsis*

Die Extraktion von genomischer DNA aus *Arabidopsis* wurde nach Brandstätter *et al.* (1994) durchgeführt. Drei bis fünf Blätter (100mg Blattmaterial) wurde in einem Porzellanmörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zerkleinert. Das Pulver wurde in 1 ml Extraktionspuffer (100mM TRIS-HCl (pH8), 50mM EDTA, 500mM NaCl, 10mM β -Mercaptoethanol, 1,5% SDS) überführt und gemischt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, vermischt und es erfolgte die Zugabe von 300 μ l Kaliumazetat (5M=3M Kaliumazetat und 2M Essigsäure). Diese Suspension wurde gemischt und für 10 Minuten bis 1 Stunde in Wassereis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 15min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Lösung wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol:Phenol im Verhältnis von 24:1:25 (v/v) gemischt, 5min bei RT inkubiert und 15 Minuten mit 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der wässrigen Phase wurde das 0,7fache Volumen an Isopropanol zugesetzt, der Ansatz für mindestens 20 Minuten bei – 20°C inkubiert und 10 Minuten mit 8000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und für mindestens 1h bei 37°C getrocknet.. Das getrocknete Pellet wurde in 100 μ l TE-Puffer (pH 8,0) gelöst, mit 10 μ g DNase-freier RNase A versetzt und der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte über Nacht bei 4- 8°C.

2.4.5 Southern-Analyse

Die genomische Reis DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *BstI*, *XbaI* und *SstI* geschnitten, in einem Agarosegel getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Als radioaktiv markierte Sonde war ein 200bp-Fragment der SET-Domäne verwendet worden.

Für die Analyse wurde genomische DNA aus *Arabidopsis* isoliert und mit Endonukleasen geschnitten. Die Trennung der geschnittenen DNA erfolgte in einem Agarose Gel einschließlich eines Transfers auf einer Nylonmembran. Diese wurde mit einer Sonde für *SUVH1* bzw. *SUVH2* hybridisiert.

Die Anzahl der T-DNA's wurde auch mittels einer Southern Analyse bestimmt, wobei die Restriktion der genomischen DNA über Nacht mit der Endonuklease *HindIII* erfolgte.

Diese geschnittene DNA wurde in einem 1%igen Agarosegel getrennt und anschließend über Vakuum auf die Nylonmembran übertragen. Diese Membran wurde mit den radioaktiv markierten Gen *NPTII* hybridisiert. Die Neomycinphosphotransferase (Kanamycin) ist der Selektionsmarker. Sie ist spezifisch für die T-DNA 35S*::mycSUVH2. Durch die Anzahl der Hybridisierungsbanden in den einzelnen Linien kann man die Anzahl der Insertionen bestimmen.

2.4.6 Transienter Expressionsassay

Für den transienten Assay erfolgte eine PCR der Gene *OsSET1*, *AtCLF*, *AtSUVH1*, *AtSUVH2* und *AtSUVH3* aus genomischer DNA, mit folgenden spezifischen Primern *OsStartSalI/OsStopSalI*, *CLF-Eco/CLF-Bam*, *Su-1StartSalI/Su-1StopSalI*, *Su-2StartBam/Su-2StopBam* und *Su-3StartXho/Su-3StopXho* amplifiziert. Diese Gene wurden in den Vektor pKExtr kloniert. Die transiente Expression der Fusionsproteine erfolgte durch den 35S-Promotor aus dem Cauliflower Mosaik Virus, wobei die Konstrukte mittels Goldpartikel (Bio-Rad) unter einem Druck von 700kPa in Zwiebelepidermiszellen eingebracht wurden. Diese Arbeiten erfolgten gemeinsam mit Ingo Schulz. Die Lokalisierung der Fusionsproteine konnte durch die Reportergene GUS bzw. GFP sichtbar gemacht werden. Für den transienten Assay wurden MS-Platten, bestehend aus 30g/l Saccharose, 20g/l Select Agar und 4,4g/l M&S Salz, als Unterlage verwendet. Für die Kultivierung der beschossenen Zwiebelhäute wurde flüssiges MS-Nährmedium mit 30g/l Saccharose und 4,4g/l M&S Salz verwendet.

Nach dem Beschuss wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet. Die GUS-Konstrukte wurden in X-GLUCA-Lösung [50mM NaPO₄ (ROTH), pH7,0; 0,5 mM Ferro/Ferri-zyanide (SIGMA); 0,05% Triton-X100 (SERVA) und 3mg/ml X-GLUC (DUCHEFA)] über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977) beruht auf einem nukleotid-spezifischem Kettenabbruch durch den Einbau eines fluoreszenz-markierten Didesoxy-nukleotids. Die als Template eingesetzte DNA wurde durch den QIAGEN Plasmid-Kit bzw. mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit der Firma Macherey & Nagel aufgereinigt.

Die Sequenzreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde nach der Resuspendierung und Denaturierung im ABI Cycle Sequencer 377 aufgetrennt.

Für die Sequenzierung der mySUVH2-Mutanten wurden verschiedene transgenspezifische Primer verwendet. Die PCR-Produkte der Taq-Polymerase wurden aus den Agarosegel eluiert und über blunt- end in den pGEM-T Vektor kloniert. Die Plasmide wurden in E.coli transformiert und vermehrt. Ihre Isolierung erfolgte über die alkalische Plasmidpräparation.

Die Anwesenheit des Fragmentes wurde mittels einer Restriktion kontrolliert, die positiven Plasmide mit dem transgenen mycSUVH2 wurden sequenziert. Die Sequenzierung des transgenen SUVH2 erfolgte mit verschiedenen genspezifischen Primern. Die verwendeten Primer mycSallI, 2RNAi5-BamH1F, Su2f527, 2RNAi5XB, 2RNAi3 BamH1, Su2StopSallI, Su2-1290F, Su2-1631B und 2RNAi3BamH1 erlaubten es, den gesamten ORF zu analysieren. Für die Sequenzierung der Taq-Produkte wurden Fragmente aus verschiedenen PCR's verwendet. Die Produkte der Pfu-PCR wurden direkt sequenziert. Ihre Sequenzierung erfolgte mit dem gleichen Primern, welche für die Taq-Produkte genutzt wurden.

2.5 PCR und DNA-Analysemethoden

2.5.1 DNA Amplifikation mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache, aber effiziente Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen).

Ein typisches Temperaturprofil sieht wie folgt aus:

- (a) *Denaturation* 95°C (30- 45sec)
- (b) *Annealing* 45-65°C (30-45sec)
- (c) *Extension* 72-74°C (1 min pro kb)

In den meisten Fällen wird die Taq- Polymerase von *Thermophilus aquaticus* verwendet. Um für die Konstrukte Ablesefehler in der Sequenz zu vermeiden, wurde für diese PCR eine Polymerase mit *proof reading* Aktivität eingesetzt. Dieses Enzym besitzt sowohl eine 5'-3' Polymerase- als auch eine 3'-5' *proof reading* Exonuklease-Aktivität, was zu einen verringerten Basenpaaraustausch führt.

Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Produktkonzentration. Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl besteht aus den Komponenten 2µl 10x PCR-Puffer, 200 µM dNTP-Mix, 0,1-0,3µM Primer1, 0,1-0,3µM Primer2 und 1 U Taq-Polymerase.

Für PCR-, RT-PCR- und Sequenzanalysen wurden Primer verwendet, welche im Anhang 5.1 aufgeführt werden.

Die PCR-Reaktionen erfolgte in PCR-Maschinen der Firmen BIOMETRA (T-GRADIENT, 3Cycler) und EPPENDORF.

2.5.2 TAIL- PCR

Die *Thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL) bietet die Möglichkeit die unbekannte flankierende Sequenz neben der T-DNA zu identifizieren. In diesen PCR Reaktionen werden eine Anzahl von nested Sequenz-spezifischen Primern für die T-DNA zusammen mit kurzen degenerierten Primern, welche eine niedrige Schmelztemperatur besitzen und unspezifisch die genomische DNA binden, verwendet. Die Annealingtemperatur wird durch die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der spezifischen Primer bestimmt. Die PCR ist in folgender Tabelle beschrieben.

Reaktion	Zyklenzahl	Programm
Primär	1	95°C 2min
	5	94°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 1min, 25°C 3min, 72°C 2min30sec
	15	94°C 30sec, 62°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	92°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Sekundär	20	94°C 30sec, 64°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min
Tertiär	20	94°C 30sec, 44°C 1min, 72°C 2min30sec
	1	72°C 5min

2.5.3 Inverse PCR

Je 1µg genomischer DNA wurde mit den Endonukleasen *RsaI*, *MspI*, *TaqI* oder *MboI* über Nacht in 100µl Gesamtvolumen geschnitten. Im Anschluss erfolgte eine Fällungsreaktion mit 10µl 3M Natriumazetat und 330µl 96% Ethanol. Das Pellet wurde in 20µl dest. Wasser gelöst.

Für die Selbstligation wurden 10µl DNA in einen Gesamtvolumen von mindestens 200µl eingesetzt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Ligation für 20min bei 85°C inaktiviert.

Für die Bestimmung des Insertionsortes der T-DNA wurden nested-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurden degenerierte Primer (Anhang 6.1) und T-DNA spezifische Primer (LR 33, LR110 und LR 133) verwendet.

2.6 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

2.6.1 Isolation von Gesamt- RNA

Alle Lösungen, die mit RNA in Berührung kamen, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem bidestilliertem Wasser hergestellt oder, wenn möglich, wurde DEPC direkt zur Lösung gegeben. Diethylpyrocarbonat wurde in einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) zugesetzt und diente der Inaktivierung von RNasen. Das mit DEPC versetzte H₂O sowie die Lösungen wurden 12 h bei 37 °C inkubiert und danach autoklaviert. Dieses Wasser wird im folgenden mit DEPC-H₂O bezeichnet. Alle Arbeiten wurden mit Einweghandschuhen durchgeführt, da die an Händen anhaftenden RNasen die Hauptkontaminationsquelle darstellen. 100mg Blattmaterial wurden unter Stickstoff zerkleinert und in 1ml Trizol (Invitrogen) gelöst. Die Suspension wurde für 5min bei RT inkubiert und danach wurden 200µl Chloroform zugegeben, gemischt und erneut für 5min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 8min bei 12.000rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 500µl Isopropanol. Die Lösung wurde gemischt und im Anschluß für 5min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50µl DEPC-H₂O resuspendiert. Diese RNA wurde für unterschiedliche Experimente eingesetzt.

Die isolierte RNA wurde in DEPC-H₂O 1:30 verdünnt und am Spektrometer (Biometra) vermessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren lag zwischen 0.5-3.5 µg/µl. Die Reinheit konnte als Quotient aus Nukleinsäuren/Protein (260/280 nm) bestimmt werden. Als Standard wurde DEPC-H₂O verwendet.

2.6.2 RT-PCR

Für die semiquantitativen RT-PCR-Experimente wurden jeweils 2µg total RNA eingesetzt. Die RNA wurde für 2 Stunden bei 37°C mit folgenden Zusätzen 10 mM dNTP, 100 pmol Random Hexamers (PROMEGA) and 200U M-MLV reverse transcriptase (M-MLV RT) (PROMEGA) inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl bzw. 50 µl. 1- 2 µl des RT-Ansatzes wurden als Template für die nachfolgende PCR verwendet. Die PCR-Bedingungen wurden den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepaßt. Zur quantitativen und qualitativen Kontrolle wurde die 18S rDNA und Actin verwendet. Diese Gene sollten in gleicher Menge in den Proben vorhanden sein.

2.6.3 Quantitative *Real Time* PCR

Die Reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, um spezifische mRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Aus Blättern isolierte RNA wird im ersten Schritt als *Template* für die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) eingesetzt. Die cDNA wird wiederum als Template für die folgende PCR verwendet, die mit spezifischen Primern arbeitet, um eine bestimmte cDNA zu amplifizieren. Um bessere quantitative Aussagen über eingesetzte mRNA Mengen machen zu können, kommen *Real-Time*-PCR-Maschinen wie der *LightCycler* von BIO-RAD zum Einsatz. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *LightCycler* die Bindung von Fluorophoren wie *SYBR Green* an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wird verstärkt, wenn das Molekül an die kleine Furche der DNA bindet. Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig.

Bei dem *LightCycler* RNA Amplifikationssystem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von QUIAGEN handelt es sich um ein 1-Schritt System mit Reverser Transkriptase und Taq-Polymerase als Enzymgemisch.

Ein typischer Ansatz einer „one step“ PCR enthält 3,5 µl H₂O (Rnase frei), 12,5 µl SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,25 µl QuantiTect RT-Mix, 2 µl Primer Mix (0.5 mM), 2 µl Gesamt-RNA (100 ng- 200 ng). Nach einem 20 minütigen RT-Schritt bei 55 °C wird eine PCR nach herkömmlichem Schema durchgeführt, d.h. pro Zyklus 5 sec Denaturierung bei 95°C, 10 sec bei Annealingtemperatur (52-66°C) und 30s-2 min Synthese bei 72°C.

Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt.

Nach im Durchschnitt 40 Replikationszyklen werden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

In der “two step” quantitative PCR wurde RNA mit Hilfe von reverse Transkriptase und random Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-*Templates* werden im Verhältnis 1:20 verdünnt und es erfolgte eine Amplifikation mit spezifischen Primern. Dieses Produkt wird weiter 1: 100 verdünnt. Für die folgende PCR werden verschiedene Konzentrationen eingesetzt (1: 10, 20, 50 und 100). Der Ansatz enthielt 10µl, 5µl, 2µl oder 1µl cDNA; 0,15 µl Primer A und Primer B; 2,5µl 1x SybrGREEN; 2,5 µl Fluorescin; 1,25 µl MgCl₂ und 0,1µl Taq-Polymerase

2.7. Affymetrix cDNA Expressionschip

Für die cDNA-Expressionsanalyse wurde der kommerziell angebotene Expressionschip der Firma Affymetrix ATH1 (Inc., Santa Clara, CA) verwendet, dieser enthält mehr als 22.500 Proben. Einige Proben werden von zwei oder mehr Genen (Targets) erkannt, dass betrifft vor allen Gene mit einer starken Ähnlichkeit. Die Proben des Assays sind 25 Bp Oligonukleotide, die auf der Matrix immobilisiert wurden. Die DNA-Array-Technik basiert auf dem Prinzip, dass zwei komplementäre Nukleinsäure- Einzelstränge sich zusammen lagern, wobei die Target-DNA in der RT-PCR mit Biotin Fluoreszenz markiert wird.

Für die Hybridisierung wurde zunächst gesamt RNA mittels Trizol isoliert. Diese Probe wurden nach dem Protokoll des *RNeasy Mini Kits* der Firma QUIAGEN aufgereinigt. Die gesamt RNA Proben wurden nach einer Konzentrationsbestimmung an Dr. U.E. Hattenhorst (Forschungszentrum für krebskranke Kinder, Universitätskliniken für Kinder- und Jugendmedizin) übergeben. Es erfolgte jeweils eine Doppelisolation der Target-DNA. Die RT-PCR und die Hybridisierung der Chips [*Arabidopsis genome GeneChips array* (ATH1)] wurde von U.E. Hattenhorst, Forschungszentrum für krebskranke Kinder im Biozentrum, durchgeführt.

Für die Messung des emittierten Lichtes wurden die GeneChip-Fluidics-Station und der Hewlett Packard-GeneArray-Scanner mit Analyse-Software verwendet. Die Fluoreszenz Signale wurden in einem zusammenfassenden Bericht (Report File) gespeichert.

Dieser wurde unter Verwendung aller Daten der 8 Chips in einer Excel-Tabelle zusammengefasst. Für jede Linie wurden zwei separate Datenspalten erstellt und es erfolgte die Ermittlung eines Mittelwertes für jedes Gen.

Für die Hybridisierung wurde die gesamtRNA aus dem Wildtyp, der Überexpressionslinie 5, der Antisenselinie 21, der Linien *svh1* und *svh2* (SALK-Mutanten) isoliert. Dieser Mittelwert wird durch den entsprechenden Mittelwert des Wildtypes dividiert und der resultierende Quotient gibt Auskunft, in welchem Verhältnis die Expression des Genes im Vergleich zum Wildtyp steht.

Alle verwendeten Linien (*35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as#21*, *svh1* und *svh2*) wurden nach dem gleichen Prozedere gerechnet, wobei der Mittelwert des Wildtypes stets 100% oder 1 gesetzt wurde. Ist der erhaltene Faktor größer eins oder 100%, so ist das Gen höher expremiert als im Wildtyp. Ein kleinerer Faktor als eins oder 100% bedeutet, dass das Gen geringer expremiert wird. Als Grenzwert einer Überexpression bzw. einer Repression wurde der Faktor 2,0 festgelegt.

2.8 Bioinformatik

Für die Datenbanksuche von DNA und Proteinen wurde BLASTN und BLASTP (www.tigrblast.org, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) verwendet.

Die Ableitung der Primer erfolgte mit Hilfe der Datenbank http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

Für die Analyse von Arabidopsis Genen wurden folgende Datenbanken verwendet www.arabidopsis.org; <http://ukcrop.net/> und <http://www.affymetrix.com>.

Für die Erstellung von Bilddateien wurden die Programme Photoshop (ADOBE SYSTEMS), POWER POINT (MICROSOFT) verwendet. Für Tabellenkalkulationen und Textverarbeitung wurde das Microsoft Office Paket (MICROSOFT) mit dem Programmen WORD und EXCEL genutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Analyse pflanzlicher SET- Domänen Proteine

3.1.1 Charakterisierung des Proteins OsSET1 aus *Oryza sativa japonica*

Zur Charakterisierung von Proteinen, die am Aufbau von Heterochromatin beteiligt sind, werden phänotypisch sichtbare Mutationssysteme verwendet. Das Modellobjekt *Drosophila melanogaster* ermöglicht die Identifizierung und funktionelle Analyse von Chromatingenen über den Effekt der Mutationen dieser Gene auf den PEV. Basierend auf bereits bekannten, am Aufbau von Heterochromatin beteiligten Proteinen besteht die Möglichkeit, homologe Proteine aus Pflanzen zu identifizieren und zu analysieren. Diese Homologie der Proteinstruktur wurde für die Isolierung des Gens *OsSET1* genutzt.

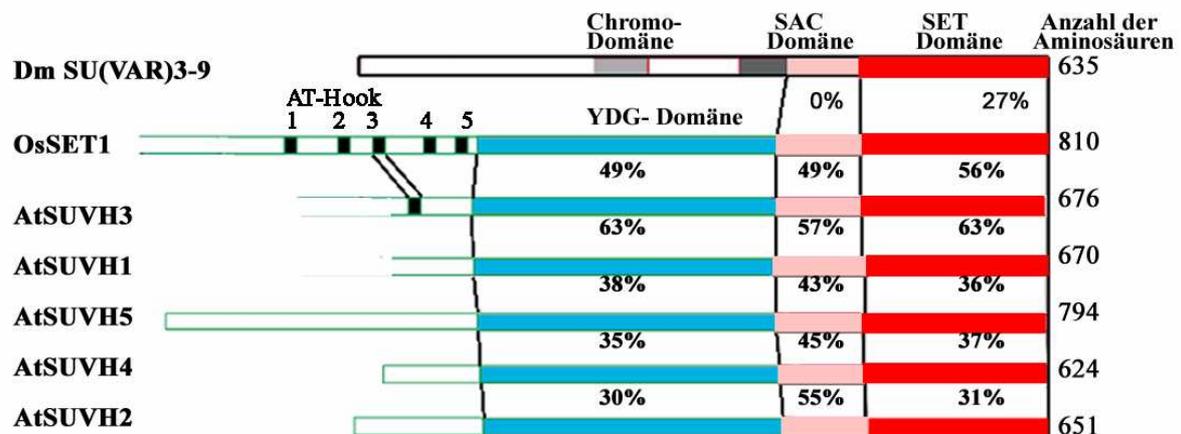
Ausgehend von einem 330bp-cDNA-Fragment (D15100; Sasaki et al., 1994) mit einer Homologie zur SET-Domäne des SU(VAR)3-9 Proteins aus *Drosophila melanogaster* wurde das SET-Domänen Protein OsSET1 aus Reis isoliert. Die Analyse der Sequenz von *OsSET1* (AF344453) erfolgte mit Hilfe des ABI 377 Sequenzers. Der längste isolierte Klon beinhaltet das Startkodon an Position 76 und das Stopkodon an Position 2514. In einem Datenbankvergleich des Proteins OsSET1 konnten drei Domänen lokalisiert werden. Die Aminosäuresequenz des Proteins, einschließlich der Domänen, wird im Anhang 5.2.1 gezeigt. Der N- Terminus von OsSET1 enthält 5 AT-Hook-Bereiche an den Aminosäurepositionen 120-134, 164-178, 204-218, 246-260 und 279-293. Diese 5 AT-Hook-Motive zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den HMGI/Y-Proteinen, welche aus anderen tierischen und pflanzlichen Organismen bekannt sind (Meijer et al., 1996). Sie enthalten die basische Aminosäuresequenz K R G R P.

Die Sequenz der YDG-Domäne von OsSET1 umfasst die Aminosäuren 353-502. Sie zeigt eine strukturelle Ähnlichkeit zu YDG-Domänen von SU(VAR)3-9 homologen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (Abb.1A). Die YDG-Domäne enthält relativ häufig die Aminosäuren Tyrosin (Y), Asparaginsäure (D), und Glycin (G). Die Ähnlichkeit der YDG-Domäne von OsSET1 zur YDG-Domäne von AtSUVH1 beträgt zum Beispiel 63%. Die YDG-Domäne ist identisch mit der beschriebenen SRA-Domäne (*SET- or Ring- assoziante domain*; Springer et al., 2003).

Sie weist eine funktionelle Ähnlichkeit zur Protein bindenden Chromo-Domäne des SU(VAR)3-9's auf.

Das *OsSET1* ist ein unikales Gen, dies konnte anhand des Restriktionsmusters in einer Southern Analyse nachgewiesen werden (Abb.1B). Das Reis Protein *OsSET1* beinhaltet folgende Domänen, 5x AT-Hook-Motive, eine YDG-Domäne und eine C-terminale SET-Domäne mit angrenzenden Zystein-reichen Bereichen. Vor allen die SET-Domäne wurde für die Identifizierung pflanzlicher SET-Domänen Proteine verwendet.

A



B

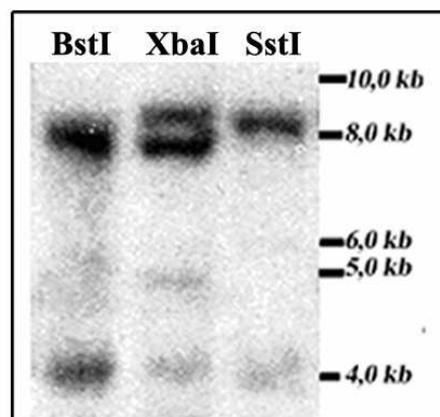


Abbildung 1: Vergleich der Proteinstruktur von *OsSET1*, einem SU(VAR)3-9 homologen Protein aus *Oryza sativa japonica* mit SU(VAR)3-9 und SU(VAR)3-9 homologen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Die Proteine aus *Reis* und *Arabidopsis* enthalten, wie das *Drosophila* Protein SU(VAR)3-9, eine C-terminale SET-Domäne mit den typischen Zystein reichen Regionen. Im N-Terminus der pflanzlichen Proteine ist die YDG-Domäne lokalisiert. Des weiteren wurden in *OsSET1* fünf AT-Hook-Motive und in *AtSUVH3* ein AT-Hook-Motiv identifiziert. **(B)** Der Nachweis des Gens *OsSET1* erfolgte in *Oryza sativa*. Genomische DNA wurde mit den Endonukleasen *BstI*, *XbaI* und *SstI* geschnitten. Das Gen *OsSET1* enthält keine Schnittstelle für *SstI* und je eine Schnittstelle für *BstI* und *XbaI*. Als Sonde wurde das 330Bp Fragment verwendet. Die Southern-Analyse zeigt, dass *OsSET1* ein unikales Gen ist.

Die C-terminale SET-Domäne von OsSET1 weist eine homologe Struktur zur SET-Domäne des SU(VAR)3-9 Proteins auf, einschließlich der angrenzenden Zystein reichen Regionen. Die SET-Domänen assoziierten Zystein reichen Bereiche (SAC) umfassen die Aminosäuren 526-631 und 797-812. Zur SET-Domäne gehören die Aminosäuren 632-779 (Abb. 2, Anhang 5.2.1). Es erfolgte ein Sequenzvergleich der SU(VAR)3-9 homologen SET-Domänen, wobei identische Aminosäuren Rot und ähnliche Aminosäuren Grün gekennzeichnet wurden. Vor allem innerhalb der SET-Domäne sind einige Aminosäuren hoch konserviert, wie zum Beispiel die Aminosäuresequenz GWG und NHSC. Diese sind in den Proteinen Dm SU(VAR)3-9, OsSET1 und in den dargestellten AtSUVH Proteinen zu finden. Die Bereiche mit hoher Homologie sind in der Abbildung 2 unterstrichen dargestellt.



Abbildung 2: Der Sequenzvergleich der SAC- und SET-Domänen erfolgte zwischen den Proteinen Dm SU(VAR)3-9, OsSET1, AtSUVH1, AtSUVH2, AtSUVH3, AtSUVH4 und AtSUVH9. In den SAC-Domänen sind vor allem die Zysteine stark konserviert. Die SET-Domänen weisen eine starke Ähnlichkeit auf, besonders stark konservierte Bereiche sind unterstrichen. Identische Aminosäuren sind rot und ähnliche Aminosäuren grün markiert.

3.1.2 Molekulare Analyse des Gens *SUVH2* in *Arabidopsis thaliana*

Die Identifizierung der SU(VAR)3-9 homologen Proteine erfolgte mittels eines Datenbanken-Vergleiches mit *OsSET1*. Es wurden in *Arabidopsis thaliana* insgesamt 10 SU(VAR)3-9 homologe SET-Domänen Proteine identifiziert (Baumbusch et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das Protein AtSUVH2 analysiert und charakterisiert. Die Sequenz von AtSUVH2 konnte auf Chromosom II bei ca. 14,1 Mb und innerhalb des Bac-Klons F4P9 (Position 25723-27678) lokalisiert werden.

Der *Open Reading Frame* (ORF) von AtSUVH2 hat eine Länge von 1956 Basenpaaren und kodiert ein Protein mit 651 Aminosäuren. Im ORF von AtSUVH2 befinden sich keine Intronen. Die Proteinsequenz von AtSUVH2, einschließlich der identifizierten Domänen, sind im Anhang 5.2.2 beschrieben. SUVH2 enthält eine 156 Aminosäuren umfassende YDG-Domäne (202-358 As) mit den stark konservierten Aminosäuren Tyrosin (Y), Asparaginsäure (D) und Glycin (G).

SUVH2 enthält im C-Terminus eine 152 Aminosäure lange SET-Domäne (494-642), die eine Homologie zur SET-Domäne des Proteins SU(VAR)3-9 aus *Drosophila melanogaster* aufweist. Im N-terminalen Bereich der SET-Domäne findet man die N-SAC-Domäne bzw. pre-SET-Domäne (Aminosäureposition 434-492). Innerhalb dieses Bereiches kommt die Aminosäure Zystein häufig in folgender Sequenz CXC(X)₃C vor.

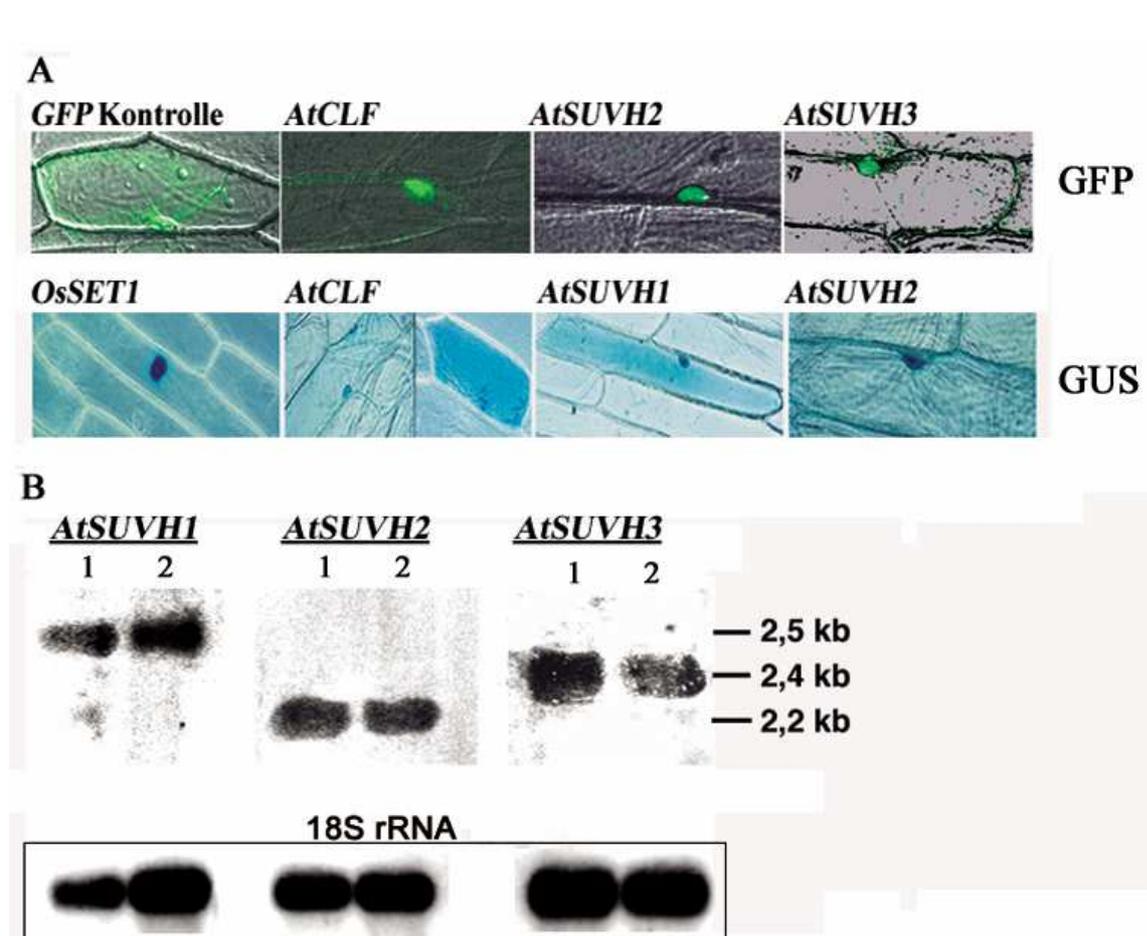
Der C-terminale Bereich, die C-SAC-Domäne oder die post-SET-Domäne umfassen die Aminosäuren 643 bis 651 mit einem konservierten Zystein (Abb. 2). Dieser Aufbau der SET-Domäne, einschließlich der angrenzenden Bereiche, ist typisch für SU(VAR)3-9 homologe Proteine. Für die funktionelle Analyse der Proteine aus *Arabidopsis* erfolgte zunächst ihre Lokalisierung in der Zelle. Dieses Resultat bietet einen ersten Hinweis auf die eventuelle Funktion dieser Proteine.

Für ihre Lokalisierung wurden die Proteine *OsSET1*, AtCLF, AtSUVH1, AtSUVH2 und AtSUVH3, transient in Zwiebelepidermiszellen, exprimiert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte durch den 35S-Promotor aus dem *Cauliflower Mosaik Virus*, wobei die Konstrukte mittels Gold-Partikelbeschuss in Zwiebelepidermiszellen eingebracht wurden. Diese Arbeiten erfolgten gemeinsam mit Herrn I. Schulz. Die Lokalisierung der Fusionsproteine konnte durch die Reporter GUS bzw. GFP sichtbar gemacht werden (Abb. 3A).

Durch Beschuss der Epidermiszellen mit den Reporterproteinen GUS und GFP wurde ihre Lokalisierung in der Zelle überprüft. Die Reporter GUS und GFP konnten im Zytosol lokalisiert werden. Anschließend erfolgte die Lokalisierung der Fusionskonstrukte in Zelle.

Die Proteine OsSET1, AtSUVH1, AtSUVH2 und AtSUVH3 wurden im Kern der Zelle lokalisiert (Abb. 3A). Das E(Z) homologe Protein CLF wurde ebenfalls im Kern der Zelle expremiert. In weiteren Versuchen erfolgte die Untersuchung der Su(var)3-9 homologen Sequenzen in *Arabidopsis*.

Mittels einer Southern-Analyse gelang der Nachweis, dass *SUVH1* und *SUVH2* unikale Gene sind (Abb. 3C).



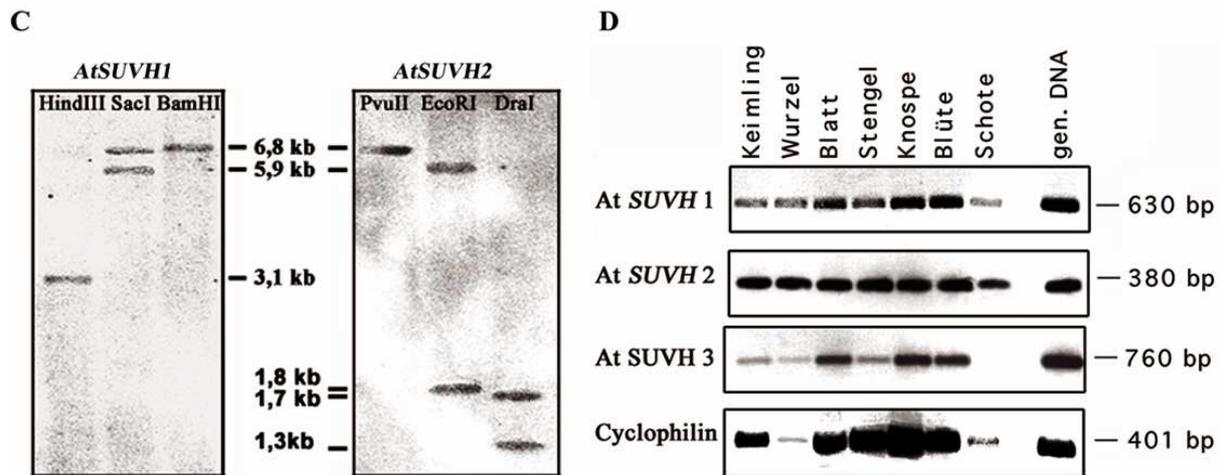


Abbildung 3: Analyse der SET-Domänen Proteine SUVH1-SUVH3 in *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Transiente Expression der Proteine OsSET1, CLF, SUVH1, SUVH2 und SUVH3 in Zwiebelepidermiszellen. Die Proteine OsSET1, SUVH1, SUVH2, SUVH3 und CLF wurden im Kern der Zelle nachgewiesen. **(B)** Die Northern-Analyse erfolgte mit gesamt-RNA aus dem Blatt (1) und der Blüte (2). Die Gene *SUVH1*, *SUVH 2* und *SUVH3* wurden im Wildtyp transkribiert. **(C)** In einer Southern-Analyse wurden die unikalen Gene *SUVH1* und *SUVH2* in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen. **(D)** In einer RT-PCR konnten die Transkripte von *CYCLOPHILIN*, *SUVH1* und *SUVH2* in allen getesteten Organen nachgewiesen werden. Das Transkript von *SUVH3* konnte im Schotengewebe nicht detektiert werden.

Des weiteren wurden die *SUVH*-Gene hinsichtlich ihrer räumlichen Expression untersucht.

In einer Northern-Analyse wurden die Produkte von *SUVH1-SUVH3* nachgewiesen (Abb. 3B). In einer RT-PCR konnten die Transkripte von *SUVH1-SUVH3* in verschiedenen Organen (Wurzel, Blatt, Sprossachse, Knospe, Blüte und Schote sowie in Keimlingen) nachgewiesen werden (Abb. 3D).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Gene *SUVH1* und *SUVH2* im Wildtyp ubiquitär expremiert werden. Es ist möglich, dass sie in der Pflanze an unterschiedlichen Prozessen im Kern beteiligt sind. In weiteren Analysen soll die Funktion von *SUVH2* analysiert werden.

Für molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen der *SU(VAR)3-9* homologen Proteine wurden transgene Linien etabliert, in denen mindestens eine zusätzliche Kopie des betreffenden Gens vorliegt.

Des weiteren wurden Konstrukte deren Orientierung im Antisense vorliegt, transformiert. In diesen transgenen Linien ist die Expression der Gene *SUVH1* oder *SUVH2* reduziert oder nicht mehr nachweisbar.

3.2. Charakterisierung transgener Linien zur funktionellen Analyse von SUVH 2

3.2.1 Überexpression von SET-Domänen Genen in *Arabidopsis thaliana*

Für die Etablierung der transgenen Linien wurden die Gene *OsSET1*, *SUVH1* und *SUVH2* über PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über pGEM-T Klonierung in den binären pBI1.4tr-myc Vektor kloniert.

Ihre Expression erfolgte mittels des modifizierten 35S*-Promotors (Mindrinos et al., 1994). Die Aktivität dieses konstitutiven 35S*-Promotors aus den *Cauliflower Mosaic Virus* ist durch eine Modifizierung im Vergleich zum 35S-Promotor um das 40fache reduziert.

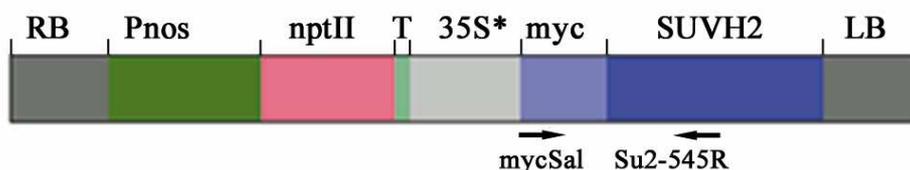
Des weiteren beinhaltet die T-DNA den Selektionsmarker Kanamycin und zwei Bordersequenzen. Über diese wird die T-DNA in das Genom eingebaut (Abb. 4A). 12 Pflanzen wurden über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Vakuum-Infiltration transformiert.

3.2.2. Analyse der transgenen Linien 35S*::*mycSUVH2*

3.2.2.1 Charakterisierung der Linien 35S*::*mycSUVH2*

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden auf Kanamycin-Platten zur Keimung gebracht und die resistenten Keimlinge wurden im Anschluss auf Erde pikiert. In der T1-Generation wurden 24 Überexpressionslinien 35S*::*mycSUVH2* etabliert. Mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR erfolgte der Nachweis des transgenen und des endogenen *SUVH2* Gens in diesen Linien (Abb. 4).

A



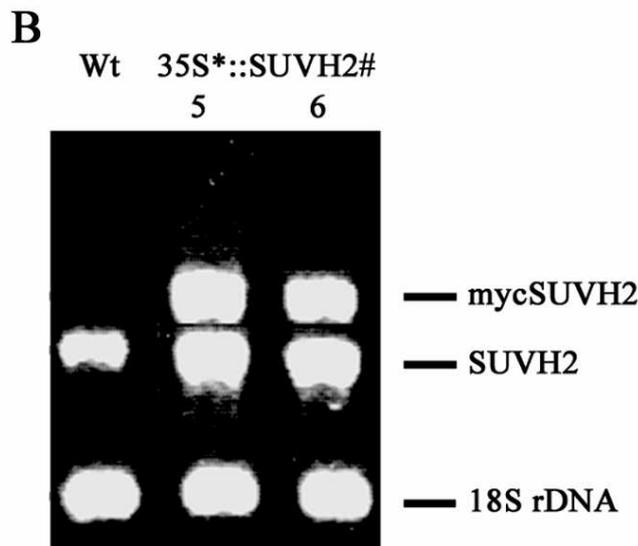


Abbildung 4: (A) Die schematische Darstellung der T-DNA, welche in das Genom von *Arabidopsis thaliana* integriert wurde. (B) Der Nachweis der T-DNA in den Linien 35S*::*mycSUVH2*#5 und #6. Mittels RT-PCR konnte das transgene und das endogene *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden. Als Kontrolle für die Menge an eingesetztem Material diente die *18S rDNA*. Der Nachweis des Transgens erfolgt nur in den Überexpressionslinien. Im Wildtyp wurde nur das endogene *SUVH2* Transkript nachgewiesen.

Als positive PCR-Kontrolle wurde die *18SrDNA* verwendet. Dafür wurden die Primer 18SrDNA-F214/18SrDNA-R478 genutzt. Diese PCR diente als Mengenkontrolle der cDNA der einzelnen Proben. Des Weiteren wurde die Transkription des endogenen und des transgenen *SUVH2* Gens überprüft. In der Wildtypprobe konnte nur das endogene *SUVH2*, nicht aber das transgene *SUVH2* nachgewiesen werden. Für den Nachweis des endogenen *SUVH2*'s wurden die genomischen Primer endoSu2-81F und Su2-545R verwendet.

Für den Nachweis des Transgens wurde der transgen-spezifische Primer mycSal und der *SUVH2* spezifische Primer Su2-545R genutzt.

Die isolierten transgenen Pflanzen der T1-Generation wurden von 1-31 nummeriert. Die T1- und T2-Generationen wurden auf Kanamycin selektiert. In der T2-Generation erfolgte eine Segregationsanalyse der Keimlinge, welche in Kanamycin resistent und sensitiv unterteilt wurden. Zeigte deren Auszählung ein Verhältnis von resistent zu sensitiv wie 3:1, so handelte es sich um eine Einzelinsertion der T-DNA. Bei einem anderen Aufspaltungsverhältnis wurde die T-DNA mehrfach ins Genom eingebaut. Die Anzahl der Insertionen ist in Anhang 5.4.1 für ausgewählte Linien aufgeführt.

Die transgenen Linien *35S*::mycSUVH2#4*, #5, #6, #8, #16, #17, #21 und #22 sind unabhängige Insertionslinien mit einer T-DNA, während die anderen transgenen Linien mehrfach die T-DNA ins Genom integriert haben (Anhang 5.4.1). Die *SUVH2* Überexpressionslinie #1 beinhaltet drei Insertionen, die Linie #2 sechs Insertionen und die Linie #3 enthält fünf Insertionen der T-DNA (Abb. 5).

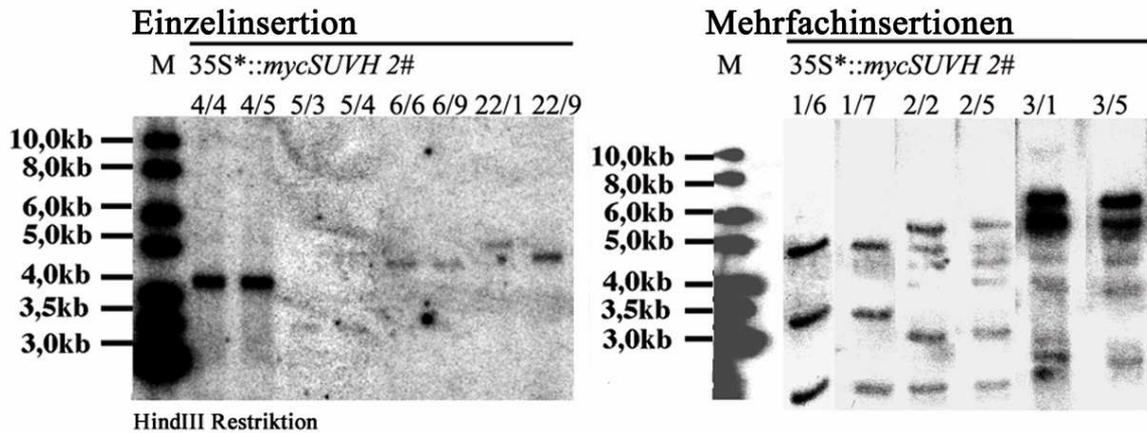


Abbildung 5: Anzahl der Insertionen in ausgewählten Überexpressionslinien. Die Bestimmung der Anzahl der T-DNA in *SUVH2* Überexpressionslinien mittels Southern Analyse. Als Sonde wurde Kanamycin verwendet. Die Linien #4, #5 und #6 zeigten eine Einzelinserktion der T-DNA, während die Linien #1, #2 und #3 eindeutig Mehrfachinsertionen der T-DNA beinhalteten.

In der T2-Generation wurde die Anzahl der T-DNA's mittels einer Southern-Analyse der Linien *35S*::mycSUVH2#1*, #2, #3, #4, #5, #6 und #22 bestimmt. Hierfür wurden jeweils 2 Pflanzen einer Linie ausgewählt, z. Bsp. #6/6 und #6/9. Die Bezeichnungen #6/6 und #6/9 beschreiben die T2-Generation der Linie *35S*::mycSUVH2#6*. In den Linien #1 und #2 wurde ein 5,0 kb Fragment und ein 2,7 kb Fragment nachgewiesen. Dies könnte auf eine tandem Situation der T-DNA hinweisen. Es erfolgte die Bestimmung der Insertionsorte der T-DNA mittels TAIL bzw. inverser PCR. Der Insertionsort wurde vorwiegend für die Linien bestimmt, die zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Von den 24 etablierten Überexpressionslinien besitzen 8 Linien eine Einfachinsertion der T-DNA. In 16 Linien wurde die T-DNA mehrfach ins Genom integriert. Diese Mehrfachinsertionen können wie folgt unterteilt werden: Neun Linien beinhalten zwei T-DNA's, vier Linien haben drei Insertionen, eine Linie enthält vier T-DNA's und jeweils eine Linie hat 5 bzw. 6 Insertionen.

Bereits in der T1-Generation zeigten 3 der 24 etablierten *SUVH2* Überexpressionslinien einen eindeutigen Phänotyp (Anhang 5.3).

Dieser dominante Phänotyp wurde von uns als „mini-Pflanzen“-Phänotyp bezeichnet. Die Linien *35S*::mycSUVH2#5*, #6 und #22, welche den "mini-Pflanzen“-Phänotyp ausbilden, beinhalten eine Einzelsinsertion der T- DNA. Für diese Linien wurde der Insertionsort bestimmt (Anhang 5.3). Über Southern-Analyse erfolgte der Nachweis, dass es sich um unabhängige Linien handelt. Für die Linie #5 konnte ein 3,5 Kb großes Fragment nachgewiesen werden. In der Linie #6 wurde ein ca. 4,5 Kb Fragment und in der Linie #22 ein 5,0 Kb bzw. ein 4,7 Kb Fragment nachgewiesen (Abb. 5).

Die Keimlinge der SUVH2-Überexpressionslinien #5, #6 und #22 bilden *curled* Kotyledonen aus und weisen eine normale Wurzelbildung auf (Abb. 6A). In den älteren Pflanzen waren die Grundrosetten kleiner und sie wiesen ebenfalls nach unten gewölbte (*curled*) Blätter auf (Abb. 6B). Ihre Wuchshöhe war im Vergleich zum Wildtyp reduziert, wobei die Linie #5 die geringste Wuchshöhe von 1-6 cm Höhe zeigte, gefolgt von der Linie #6 mit 3-9 cm Wuchshöhe. In der Linie *35S*::mycSUVH2#22* wurde eine Wuchshöhe von 5-16 cm beobachtet. Im Vergleich zum Wildtyp, der eine Höhe von 25-37 cm erreicht, zeigte die Linie #22 einen schwächer ausgeprägten "mini-Pflanzen“-Phänotyp (Abb. 6C).

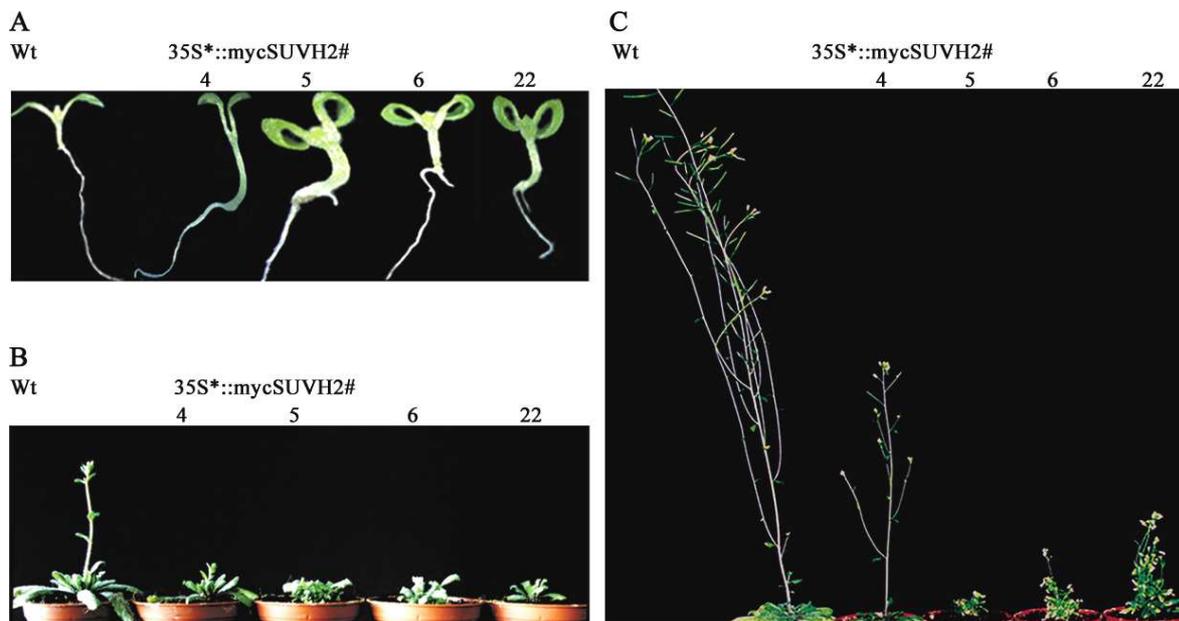


Abbildung 6: Der „mini-Pflanzen“ Phänotyp resultiert aus der SUVH2 Überexpression. (A) Die Keimlinge von SUVH2 Überexpressionslinien mit Phänotyp zeigen *curled* Kotyledonen, während eine schwache Überexpression von SUVH2 (#4) keinen phänotypischen Effekt auf die Kotyledonen hat. (B) Die Grundrosetten der Linien #5, #6 und #22 sind kleiner als im Wildtyp und in der Linie #4, welche keinen „mini-Pflanzen“ Phänotyp aufweist. Die *curled* Rosettenblätter sind nur in den Linien #5, #6 und #22 zu finden. Des weiteren kommt es in den „mini-Pflanzen“ zu einer späteren Blüte als im Wildtyp. (C) Die Überexpression von SUVH2 weist eine geringere Wuchshöhe als der Wildtyp auf, wobei die Ausprägung des „mini-Pflanzen“ Phänotyps in den Linien #5, #6 und #22 unterschiedlich sind.

Die Überexpressionslinie #4 zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein verzögertes Wachstum, sonst treten keine phänotypischen Veränderungen auf (Abb. 6C).

In den "mini-Pflanzen" erfolgte die Blüte zu einem späteren Zeitpunkt als im Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Abb. 6B). Sie bilden kleinere Schoten aus und ihre Schotenentwicklung beginnt später als im Wildtyp. Im homozygoten Zustand der "mini-Pflanzen" ist eine signifikante Reduzierung ihrer Fertilität zu beobachten, ohne jedoch ein klares numerisches Muster erkennen zu lassen (Abb. 7). Im Vergleich zu den mehr als 10.000 Samen pro Wildtyppflanze erhält man nur einen Bruchteil der Samen pro homozygote "mini-Pflanze". Des Weiteren sind Teile dieser Samen nicht keimfähig (Abb. 7). Des Weiteren wurde in "mini-Pflanzen" eine verzögerte Seneszenz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (mündliche Mitteilung N. Sommer).

Der "mini-Pflanzen"-Wuchs der Linien *35S*::mycSUVH2#5*, #6 und #22 ist ein direkter Effekt der Überexpression von SUVH2. In einem Westernblot konnte durch Frau Anne Kathleen Aurich eine erhöhte Menge des transgenen mycSUVH2-Proteins in den "mini-Pflanzen"-Linien nachgewiesen werden (Naumann et al., 2005).

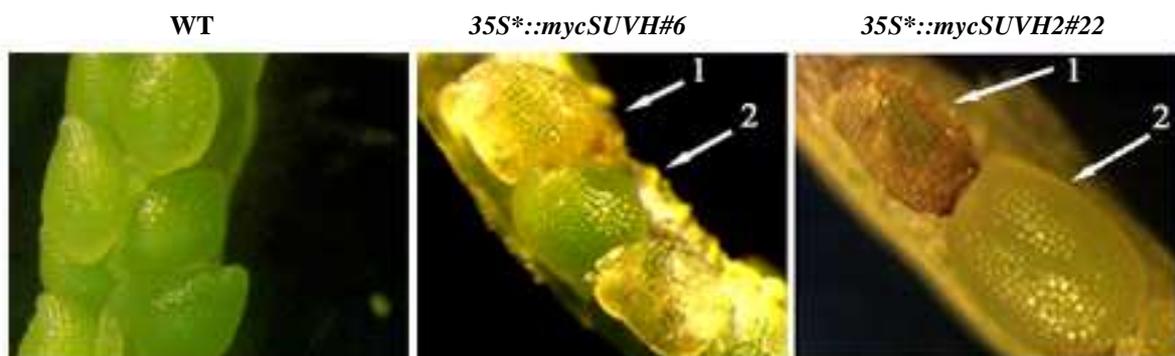


Abbildung 7: Samenentwicklung in homozygoten Überexpressionspflanzen von SUVH2. Es kommt zur teilweisen nicht Keimungsfähigkeit der Samen in den Linien #6 und #22. Sterile Samen (1) zeigen eine bräunliche bis wässrige Färbung und wirken ausgetrocknet, während fertile Samen (2) eine gelblich-grüne Färbung und eine feuchte und unebene Oberfläche aufweisen.

Als Kontrolle für die Spezifität des myc-Antikörpers wurde der Wildtyp verwendet. Die verstärkte Heterochromatisierung der DNA in den Überexpressionslinien konnte durch vergrößerte Zentromerbereiche in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen sichtbar gemacht werden (G. Hause).

Durch eine Überexpression von SUVH2 kommt es zur Ausbildung von *curled* Kotyledonen und *curled* Blättern. Des Weiteren wird der „mini-Pflanzen“-Phänotyp, mit einer geringeren Wuchshöhe als der Wildtyp, ausgebildet.

3.2.2.2 Der Einfluss von *SUVH2* auf die Expression der *SUVH*-Gene in *Arabidopsis thaliana*

Der Effekt der Überexpression von *SUVH2* auf die Expression der Su(var)3-9 homologen Gene *SUVH1*, *SUVH3-SUVH9* wurde untersucht. Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Expression von *SUVH2* einen Effekt auf die Transkription der anderen *SUVH*-Gene hat und wie hoch *SUVH2* in den Linien mit Phänotyp expremiert wird. Die Anwesenheit des *mycSUVH2* bzw. der T-DNA wurde bereits nachgewiesen, ohne jedoch ihre Konzentration zu bestimmen.

In einer Expressionsanalyse mit Hilfe des Affymetrix Expressionschips konnte keine Änderung der Expression der Transkripte *SUVH1*, *SUVH3-SUVH9* gezeigt werden. In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurde eine höhere Expression von *SUVH2* um den Faktor 20,7 nachgewiesen. Die Transkripte von *SUVH1*, *SUVH4* und *SUVH9* zeigten keine Veränderung. Dieses Ergebnis wurde mittels einer quantitativen *Real Time*-PCR (QRT-PCR) bestätigt.

In den Überexpressionslinien mit Phänotyp erfolgte zunächst die quantitative Bestimmung der Menge an *SUVH2*, sowohl des transgenen als auch des endogenen Transkriptes. Für die Ermittlung der Menge wurden verschiedene semi-quantitativen RT-PCR's einschließlich der Methode der quantitativen *Real Time* PCR genutzt (Abb. 8).

Neben der Bestimmung der Menge an *SUVH2* wurde die Konzentration der anderen *SUVH*'s (*SUVH1*, *SUVH3-SUVH9*) bestimmt. Es sollte ermittelt werden, ob durch Überexpression von *SUVH2* eines der anderen *SUVH*-Gene ebenfalls in seiner Expression verändert ist.

Dies wäre ein Hinweis für den Einfluss von *SUVH2* auf die Expression der *SUVH*-Gene. Für die quantitativen *Real Time* PCR's und die semiquantitativen RT-PCR's wurden die Primer aus Anhang 5.1. verwendet. Die erhaltenen Expressionsdaten der *SUVH*-Gene wurden durch dem Wert der *18SrDNA*-PCR dividiert, so erhielt man normalisierte Werte für die Transkription der Gene *SUVH1-SUVH9*.

Der Wildtyp diente als Standard und wurde für jedes nachgewiesene Gen auf den Wert 1 gesetzt. In der Linie *35S*::mycSUVH2#6* wird *SUVH2* 17 bis 21 mal stärker expremiert als im Wildtyp (Abb. 8).

Die Expressionen der Gene *SUVH3- SUVH5* und *SUVH7-SUVH9* blieben in der Linie *35S*::mycSUVH2#6* unverändert. Dieses Ergebnis weist auf keine Beeinflussung der Expression von *SUVH3-SUVH5* und *SUVH7-SUVH9* durch das Gen *SUVH2* hin.

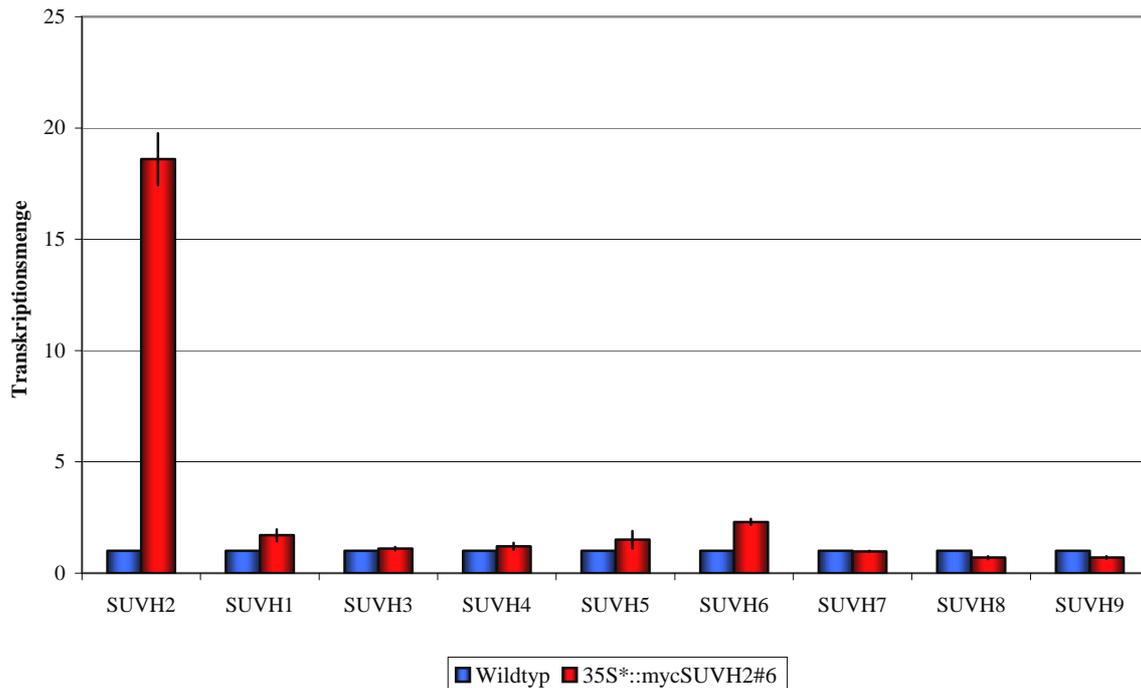


Abbildung 8: Die Expression der Su(var)3-9-homologen Gene im Wildtyp und in der Linie *35S*::mycSUVH2#6*. Mit Hilfe der quantitativen Real Time-PCR wurde in der Linie 6 eine erhöhte Transkriptmenge an SUVH2 nachgewiesen. Die Transkripte von *SUVH1*, *SUVH3-SUVH9* werden wie im Wildtyp expremiert.

In der Linie *35S*::mycSUVH2#6* wurde für das Transkript von *SUVH1* eine leichte Erhöhung der Expression um den Faktor 1,7 nachgewiesen. Einen größeren Einfluss hatte die Überexpression von *SUVH2* auf die Transkriptmenge von *SUVH6*, welche um den Faktor 2,3 erhöht vorlag.

3.2.3 Dosis abhängiger Effekt von SUVH2

3.2.3.1 Analyse der *svh2* SALK-Mutante und der transgenen Linien *35S*::SUVH2as*

Neben den Linien *35S*::SUVH2as* wurden auch die SALK-Mutanten *svh1* und *svh2* analysiert. Diese Linien wurden in der T1-Generation über Kanamycin selektiert. Für weitere Untersuchungen wurden größtenteils homozygote Pflanzen verwendet. Zunächst erfolgte in den Linien *35S*::SUVH2as* der Nachweis des endogenen *SUVH2*-Transkriptes (Abb. 9B). In dieser PCR kamen der endogene Primer endo-81F und der *SUVH2* spezifische Primer Su2r-545 zum Einsatz.

In der SALK-Mutante *suvh2* erfolgte der Nachweis der T-DNA mit einem T-DNA spezifischen Primer und dem *SUVH2* spezifischen Primer Su2-1290F (Abb. 9A). In den homozygoten *SUVH2* Antisenselinien #5, #11, #15 und #20 wurde kein *SUVH2*-Transkript nachgewiesen (Abb. 9B). Eine reduzierte Menge an endogenen *SUVH2* wurde in den Linien #21 und #25 erhalten.

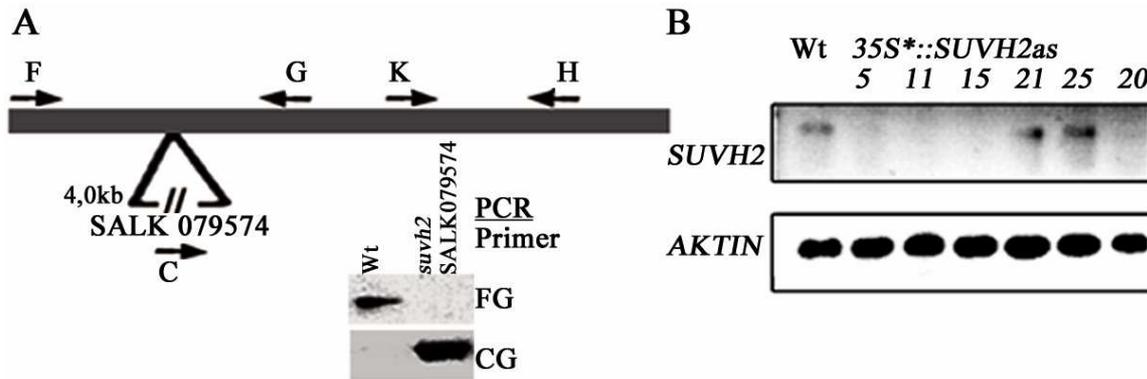


Abbildung 9: Analyse der Expression von *SUVH2* in verschiedenen Antisenselinien und in der Nullmutante. (A) Der Nachweis der T-DNA erfolgte mit dem Primer G und dem T-DNA spezifischen Primer C. Des weiteren wurde mit den Primern F und G das endogene *SUVH2* nachgewiesen. In der homozygoten *suvh2* SALK-Mutante wurde mittels PCR die T-DNA nachgewiesen, nicht aber das endogene *SUVH2*. (B) In den homozygoten *35S*::SUVH2as* Linien wurden mit dem Primern K und H das *SUVH2*-Transkript nachgewiesen. In den Linien *35S*::SUVH2as*#5, #11, #15 und #20 konnte kein Transkript detektiert werden.

Nach der Charakterisierung der Expression des endogenen *SUVH2*-Transkriptes in den homozygoten Pflanzen wurden mittels PCR und semiquantitativer RT-PCR diese Linien weiter analysiert. In der *suvh2* SALK-Mutante konnte mittels PCR der beschriebene Insertionsort der T-DNA bestätigt werden (Abb. 9A).

In einigen homozygoten Antisenselinien und in den SALK-Linien *suvh1* und *suvh2* wurden die Transkriptmengen des endogenen *SUVH1* bzw. *SUVH2* überprüft, hierfür wurde die Methoden der semiquantitativen RT-PCR (Abb. 10A) und der quantitativen *Real Time*-PCR (Abb. 10B) verwendet. In der semiquantitativen RT-PCR wurden je eine Antisenselinie und eine SALK-Linie für *SUVH1* und *SUVH2* verwendet. Die Kontroll-PCR *18S rDNA* zeigte, dass gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden (Abb. 10A). Es konnte in der Linie *35S*::SUVH1as*#9 und der *suvh1* Mutante kein *SUVH1* Transkript nachgewiesen werden (Abb. 10A). Das gleiche Resultat wurde in den Linien *35S*::SUVH2as*#11 und *suvh2* in Bezug auf das *SUVH2*-Transkript erhalten (Abb. 10A).

Für die Linie *35S*::SUVH1as#9* und für die *svh1* Mutante wurde keine Änderung der Transkription hinsichtlich *SUVH2-SUVH4* und *SUVH9* gezeigt. In der Linie *35S*::SUVH2as#11* und in der *svh2* Mutanten hingegen konnte keine Veränderung der Transkription für *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH4* und *SUVH9* gezeigt werden (Abb.10A).

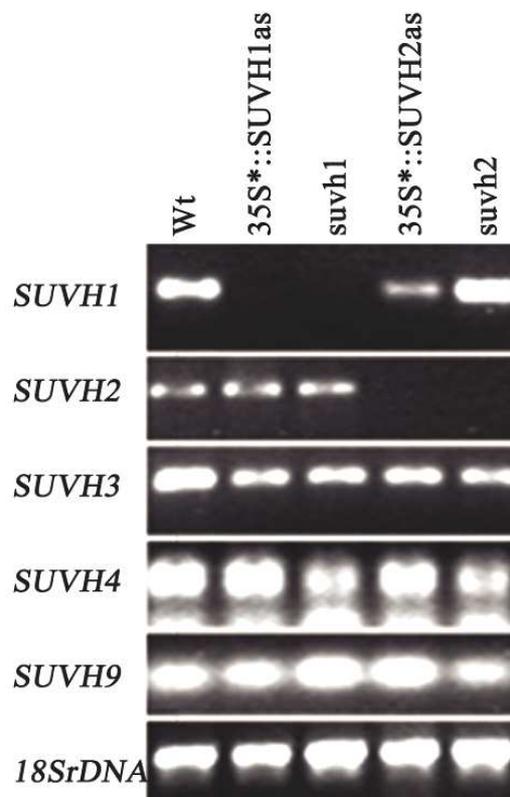
Die quantitative *Real Time*-PCR bietet die Möglichkeit, die Konzentration der Transkripte zu bestimmen und kam für die Analyse der Linien *35S*::SUVH2as#11*, #24 und #25, sowie der SALK-Linien *svh1* (13, 33) und *svh2* (41, 44) zum Einsatz (Abb. 10B).

In der quantitativen *Real Time*-PCR wurde das *AKTIN* als Normalisierungs- bzw. Kontrollgen verwendet. Die Transkriptmenge des Wildtyps wurde auf den Wert 1 gesetzt. Die Expression des Wildtyps konnte direkt mit der Expression in den anderen Linien verglichen werden.

Mittels *QRT-PCR* wurde in den *SUVH2*-Antisenselinien #11, #24 und #25, die Transkriptmenge für *SUVH2* bestimmt (Abb. 10B).

Des weiteren wurden in den SALK-Mutanten *svh1* und *svh2* die jeweiligen Transkripte nachgewiesen. In der *svh1*-Linie #33 konnte kein *SUVH1*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 10B), während die Linie #13 keine Änderung in der Transkription aufwies. In der homozygoten *svh2*-Mutante #44 wurde kein *SUVH2*-Transkript nachgewiesen. In der Linie #41 konnte eine reduzierte Menge an *SUVH2* gezeigt werden (Abb. 10B).

A



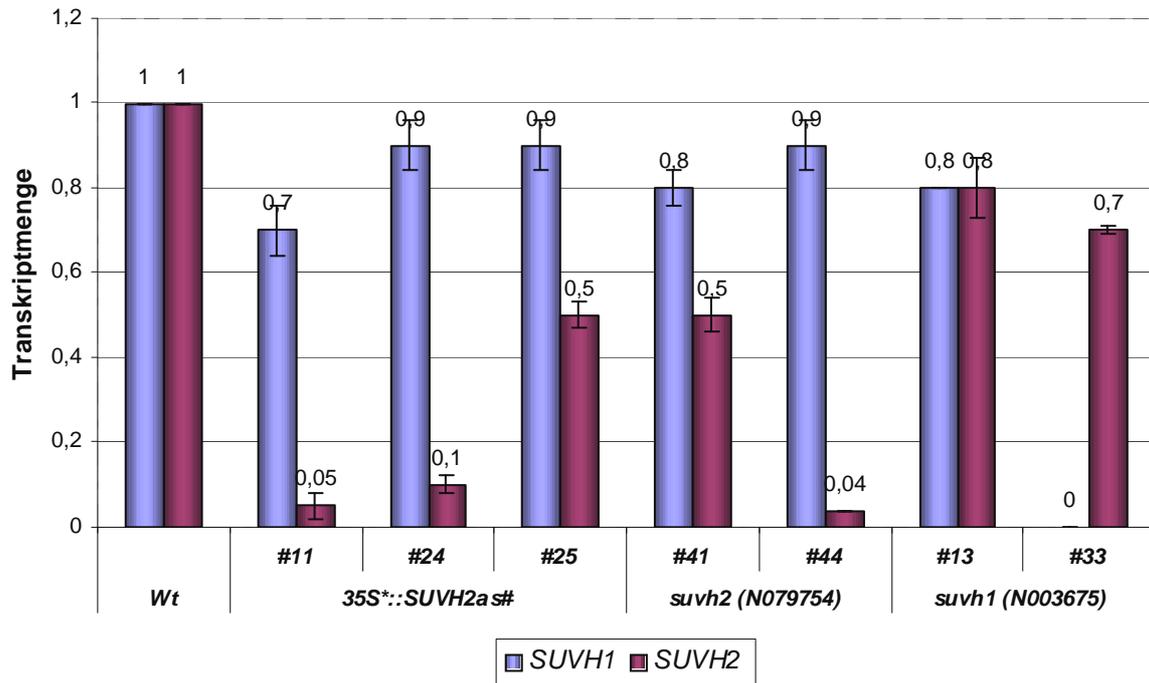
B

Abbildung 10: Expression von *SUVH1* und *SUVH2* in Antisenselinien und in SALK-Mutanten.

(A) Mittels semiquantitativer RT-PCR erfolgte der Nachweis der Gene *SUVH1-SUVH4* und *SUVH9* in den Linien *35S*::SUVH1#9*, *suvh1*, *35S*::SUVH2as11* und *suvh2*. Es konnte in den *35S*::SUVH1#9* und *suvh1* kein *SUVH1* Transkript und für die Linien *35S*::SUVH2as11* und *suvh2* kein *SUVH2*-Transkript nachgewiesen werden. Die Transkription der anderen SUVH-Gene blieb unbeeinflusst. (B) In der Real Time PCR konnte in der Linie *suvh1#33* kein Transkript für *SUVH1* nachgewiesen werden. Das Transkript *SUVH2* konnte nicht in den Linien *35S*::SUVH2as#11* und *#24*, sowie in der SALK-Linie *suvh2#44* detektiert werden.

Die hemizygoten bzw. homozygoten Linien *35S*::SUVH2as* und die SALK-Mutanten zeigen keinen signifikanten Phänotyp. Für die homozygoten Linien *35S*::SUVH2as#11* und *#24* konnte kein *SUVH2*-Transkript in der quantitativen *Real Time-PCR* nachgewiesen werden. In der Linie *35S*::SUVH2as#25* wurde in der *QRT-PCR* und in der semiquantitativer PCR eine reduzierte Menge an *SUVH2* nachgewiesen.

In diesen Linien ist die Expression der Gene *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH4* und *SUVH9* unverändert. Das gleiche Ergebnis wurde in der SALK-Mutante *suvh2* erhalten. In der homozygoten *suvh1#33* SALK-Linie konnte kein *SUVH1* Transkript detektiert werden. Die Transkription der anderen Gene blieb unbeeinflusst.

3.2.3.2 Der Einfluss von *SUVH2* auf die Transkription von *MET1*, *CMT3* und *DDM1* in *Arabidopsis thaliana*

Neben dem Effekt von *SUVH2* auf die Expression der anderen *SUVH*-Gene wurde auch der Effekt von *SUVH2* auf die Expression der bekannten DNA-Methyltransferasen *MET1* und *CMT3* untersucht. Des Weiteren wurden in den Linien *35S*::mycSUVH2#6*, *35S*::SUVH2as11* und *suvh2#44* der Einfluss auf die Transkriptmenge von *DDM1* untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten mittels der *Real Time*-PCR bzw. der semiquantitativen PCR. Als Standard wurde die *18S rDNA* PCR verwendet.

In der Linie *35S*::mycSUVH#6* konnte eine erhöhte Transkriptmenge der Gene *DDM1* und *MET1* nachgewiesen werden (Abb. 11). In der Linie *35S*::SUVH2as#11* wurden reduzierte Transkriptmengen für *MET1* und *DDM1* nachgewiesen. Die Expression von *CMT3* blieb unverändert.

In der *suvh2* Nullmutante wurde keine signifikante Veränderung der Expression von *CMT3* festgestellt, nur die Transkriptmengen von *MET1* und *DDM1* sind im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

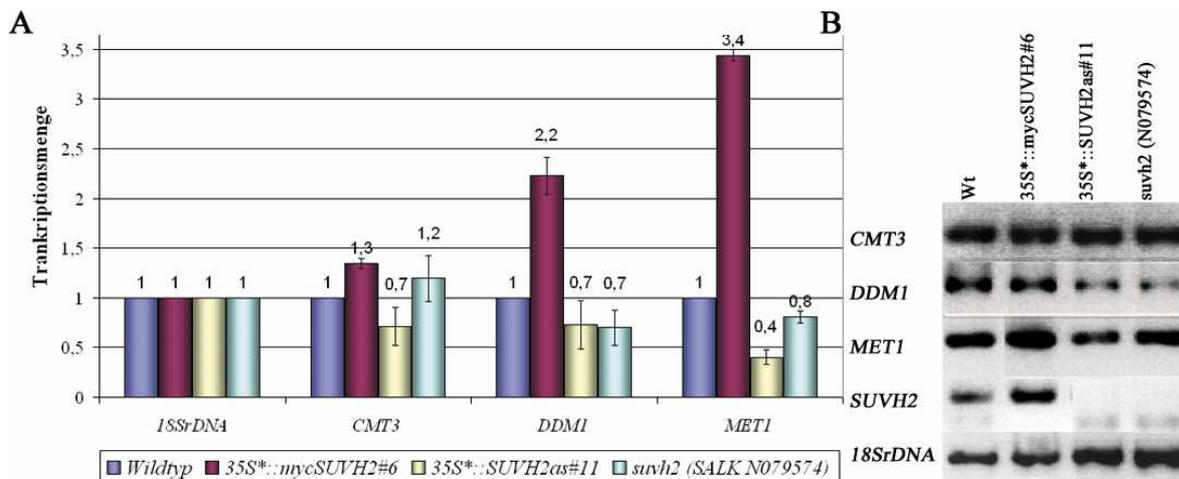


Abbildung 11: Einfluss von *SUVH2* auf die Transkription der Gene *CMT3*, *MET1* und *DDM1*. Der Nachweis der Expression von *DDM1*, *CMT3* und *MET1* erfolgte in den Linien *35S*::mycSUVH2#6*, *35S*::SUVH2as#11* und in der Linie *suvh2* (SALK N079574). Für *DDM1* und *MET1* wurde eine erhöhte Expression in der Linie *35S*::mycSUVH2#6* nachgewiesen, während die Expression von *CMT3* unverändert blieb. Die Linie *35S*::SUVH2as#11* zeigte vor allen eine reduzierte *MET1* und *DDM1* Transkriptmenge, während die Transkription von *CMT3* unverändert ist. In den Linien *suvh2*, *35S*::mycSUVH2#6* und *35S*::SUVH2as#11* wurden keine Veränderungen der Expression von *CMT3* festgestellt. Dieses Expressionsmuster wurde sowohl in einer quantitativen *Real Time*-PCR (A) als auch in einer semiquantitativen PCR (B) erhalten.

Die Expression der Methyltransferase *CMT3* blieb in allen Proben unverändert (Abb. 11). Die Gene *DDM1* und *MET1* wiesen auch bei der Expressionsanalyse mit dem Affymetrix Chip eine leicht erhöhte Expression um den Faktor 1,5 bzw. 1,6 auf.

In der Linie *35S*::mycSUVH#6* kommt es zu einer direkten bzw. indirekten Beeinflussung der Expression der untersuchten Gene *DDM1* und *MET1*.

3.3. Einfluss von SUVH2 auf die genomweite Genexpression

3.3.1 Einfluss von SUVH2 auf die Expression von SET-Domänen Gene

Die Überexpression von SUVH2 verursacht eine reduzierte Expression von Retrotransposons, wie zum Beispiel Athila. Im Folgenden wurde der Dosis abhängige Effekt von SUVH2 auf die genomweite Genexpression untersucht. Zur Anwendung kam der Gen Expressionschip der Firma Affymetrix.

Es wurde die Expression von *Arabidopsis thaliana* Wt mit der Expression in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as#21* und *suvh2* verglichen. In der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* wurden insgesamt 485 Gene *down*-reguliert und 400 Gene wurden in ihrer Expression *up*-reguliert. In der Linie *35S*::SUVH2as#21* mit reduzierter *SUVH2* Transkriptmenge wurden 605 *down*- und 955 *up*-regulierte Gene identifiziert. Für die homozygote *suvh2* SALK-Mutante wurden 896 *up*- und 442 *down*-regulierte Gene gefunden. Es wurden vor allen die genomweiten Expressionsveränderungen in der Linie *35S*::mycSUVH#5* untersucht.

In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurde *SUVH2* um das 20fache höher expremiert als im Wildtyp. In der *suvh2* Linie konnte kein Transkript nachgewiesen, während in der hemizygoten Linie *35S*::SUVH2as#21* *SUVH2* in reduzierter Menge nachgewiesen wurde. Die Gene *SUVH1*, *SUVH3-SUVH9* zeigten keine Veränderungen ihrer Expression in den analysierten Linien.

Keine Veränderung ihrer Expression zeigen auch die Su(var)3-9 verwandten Gene *SUVRI-SUVR5*. Diese Gene enthalten zwar die Su(var)3-9 typische SET-Domäne, aber in ihrem C-Terminus fehlt die für SUVH-Proteine typische YDG-Domäne.

Der Expressionschip zeigte weitere Veränderungen der Transkriptmenge von SET-Domänen Genen, die in Folge beschrieben werden.

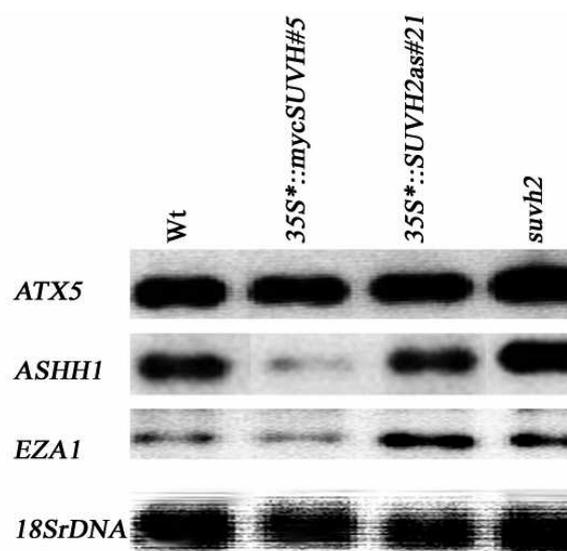
Im Vergleich mit dem Wildtyp wurde für die Linie *35S*::mycSUVH2#5* eine um das 25fache reduzierte Expression des Transkriptes *ASHH1* nachgewiesen. Die Expression der anderen *ASH*-Homologen in *Arabidopsis* blieb unverändert. Die Expression der *TRITHORAX*-homologen Gene blieb in allen untersuchten Linien unbeeinflusst.

Des weiteren wurden keine Veränderungen der Transkriptmenge der Enhancer of zeste Homologen *CLF* und *MEA* festgestellt. Das Gen *EZA1* (*SWN*) zeigte in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* eine Reduzierung der Expression um die Hälfte, während die Linie *35S*::SUVH2as#21* eine 2fach höhere Expression aufwies.

Diese Expressionsdaten wurden in einer semiquantitativen RT-PCR überprüft (Abb.12A). In dieser PCR konnte in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* eine stark reduzierte Transkriptmenge von *ASHH1* und eine leichte Reduzierung der Transkriptmenge *EZA1* nachgewiesen werden. In der Nullmutante *suvh2* konnte eine erhöhte Transkription für *ASHH1* und *EZA1* gezeigt werden (Abb. 12A). Die Linie *35S*::SUVH2as#21* mit reduzierter *SUVH2* Transkriptmenge wies eine erhöhte Menge an *EZA1* Transkript auf, während die Transkriptmenge für *ASHH1* unverändert bleibt.

Des weiteren wurden eine Reihe von Gene reduziert expremiert, welche eine Rolle bei Seneszenz-, Transport- und Entwicklungsprozessen spielen (Abb. 12B, Anhang 5.6.1). Eine Zusammenfassung dieser Gene ist für die Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* in Abbildung 12B graphisch dargestellt.

A



B

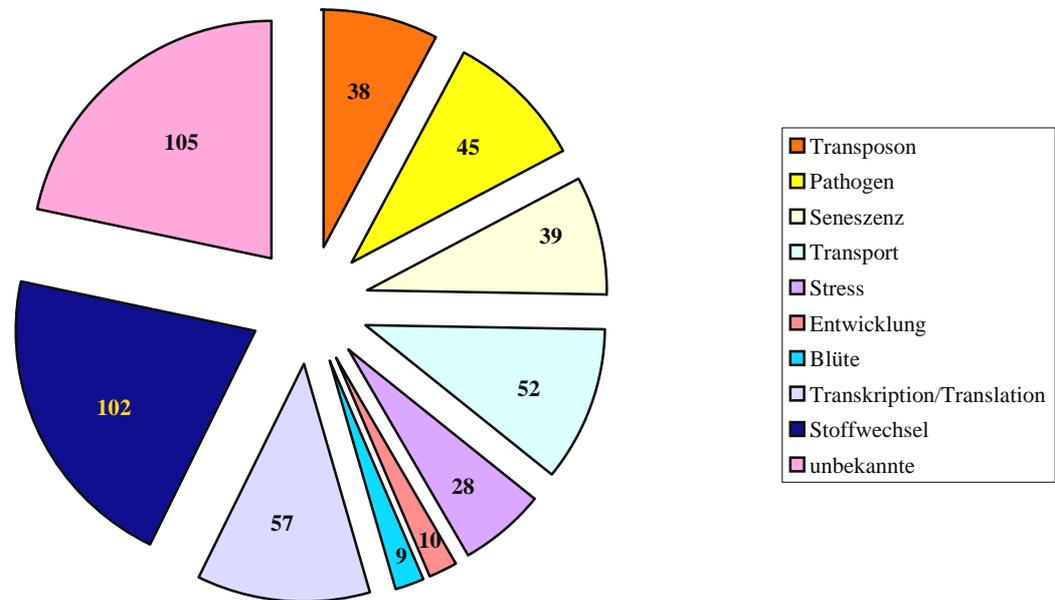


Abbildung 12: Zusammenfassung, der in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* veränderten Expression. (A) Die Überprüfung der Affymetrix-Daten mittels semiquantitativer *Real Time*-PCR. Die Expression von ASHH1 und EZA1 ist in der Linie 5 reduziert. (B) Eine Unterteilung, der in der Überexpression *SUVH2* suppremierten 485 Gene.

3.3.2 Änderung der Expression von transponiblen Elementen

3.3.2.1 Der Einfluss von *SUVH2* auf die Expression des Retrotransposons *ATHILA* in *Arabidopsis thaliana*

Die Transkriptionsanalyse mit Hilfe des Affymetrix Expressionschips zeigte eine Änderung der Expression von einigen Transposons. Für diesen Expressionsvergleich wurden die Daten von insgesamt 135 Transposons verwendet, wobei der Wildtyp *Arabidopsis thaliana* als Standard eins gesetzt wurde.

Die analysierten Transposons zeigten eine Veränderung ihrer Expression in Abhängigkeit der *SUVH2*-Transkriptmenge. In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurden ca. 38 Transposons reduziert expremiert und 17 Transposons zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Expression (Abb. 13).

In der Nullmutante *svh2* (SALK N079574) exprimierten 99 Transposons stärker. Für 18 Transposons konnte eine reduzierte Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abb. 13).

In der Linie *35S*::SUVH2as#21* mit reduzierter *SUVH2*-Transkriptmenge wurden 22 Transposons *down*- und 61 Transposons *up*-reguliert (Abb. 13).

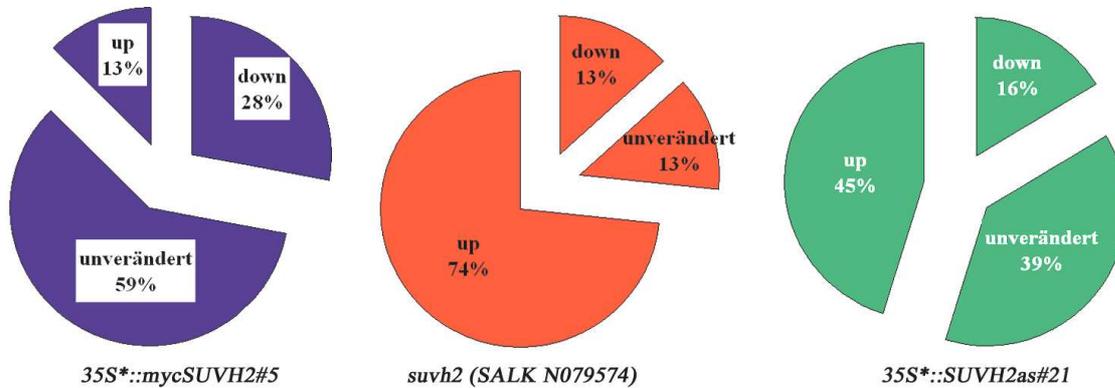


Abbildung 13: Änderung der Expression von 135 ausgewählten Transposons in verschiedenen Genotypen. In der Überexpressionslinie werden mehr Gene *down*- als *up*-reguliert. In den Linien mit reduzierter *SUVH2*-Transkriptmenge und die Nullmutante *svh2* zeigen für mehr Transposons eine erhöhte Expression als eine verminderte.

In Folge wurden die *down*-regulierten Transposons der Überexpressionslinie näher untersucht. Die Linie *35S*::mycSUVH2#5* zeigte reduzierte Transkriptmengen für die Retrotransposons *ATHILA*, *EN/SPM*, *COPIA*, *TAT* und *TA11*. In geringerem Umfang liegen auch die Transkriptmengen der DNA-Transposons *CACTA* und *MUTATOR* reduziert vor (Anhang 5.4). Zunächst werden die Veränderungen der Transkription des Retroelementes *Athila* untersucht.

Für die gleichen Transposons, welche in der Überexpressionslinie #5 reduziert exprimiert werden, konnten in der *svh2* Nullmutante und in der Linie *35S*::SUVH2as#21* eine erhöhte Transkriptmenge nachgewiesen werden. In der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* wurden die Retrotransposons *ATHILA* (*ATHILA1*, 5 und 6; Wright et al., 2001) im Vergleich zum Wildtyp reduziert exprimiert (Abb. 14).

In der hemizygoten Linie *35S*::SUVH2as#21* und in der *svh2* SALK-Mutante erfolgte eine erhöhte Expression von *ATHILA5* und *ATHILA6*. Die Expression von *ATHILA1* (At1g41797) wird in den Linien *35S*::SUVH2as#21* und *svh2* im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Durch veränderte Mengen an *SUVH2* Transkript ergeben sich unterschiedliche Expressionsmuster für das Retrotransposon *Athila* (Abb. 14; Wright et al., 2001).

Die Retrotransposons der Gruppe *ATHILA* weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu Viren auf. Sie enthalten die Gene *env*, *pol* und *gag* (Feschotte et al., 2002). Aufgrund der Suppression der Expression von *ATHILA* in Überexpressionslinien und hinsichtlich der strukturellen Ähnlichkeit zu Viren wurde die Expression der *SUVH*-Gene im Wildtyp während einer Infektion mit dem Potyvirus *TuMV* untersucht (Abschnitt 3.6).

Durch die Überexpression von *SUVH2* bzw. deren Wegfall oder Reduktion wird eine Reihe von Genen verändert expremiert.

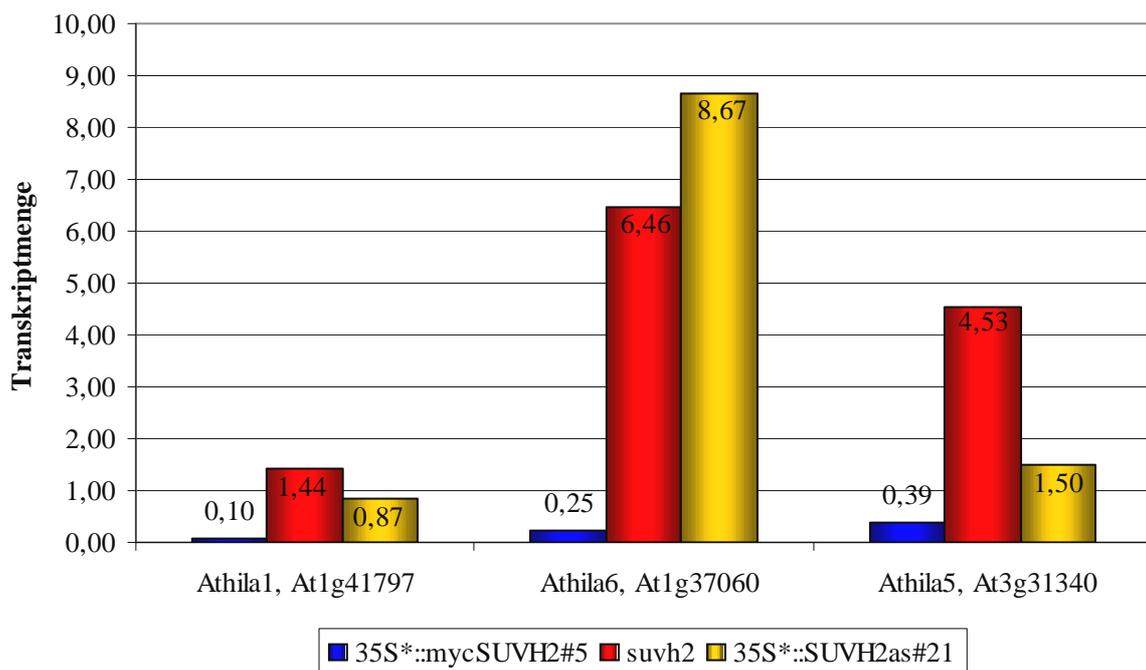


Abbildung 14: Änderung der Expression des Retrotransposons *ATHILA* in Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *suvh2* (SALK N079574) und *35S*::SUVH2as#21*. Es erfolgte eine reduzierte Expression des Transposons *ATHILA* in der *SUVH2*-Überexpressionslinie #5 und es resultierte eine erhöhte *ATHILA* Expression in der Linie *35S*::SUVH2as#21* bzw. in der *suvh2* SALK-Mutante.

3.3.2.2 Einfluß von *SUVH2* auf die Expression von verschiedenen Transposons

Neben *ATHILA* wurde die Transkription der Transposons *Dell*, *T1*, *PttA*, *Tal-1*, *En/Spm* und *Ac* mittels semiquantitativer PCR geprüft. Dieser Vergleich wurde mit den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as#21*, *suvh2* und dem Wildtyp durchgeführt. Die PCR *18S rDNA* und die PCR *ATHILA* wurden als Kontroll PCR's verwendet (Abb. 15).

In der Nullmutante und in der hemizygoten *35S*::mycSUVH2as21* mit reduzierter *SUVH2* Menge wurde eine erhöhte Menge an *ATHILA* Transkript nachgewiesen (Abb. 15, Anhang 5.6.2). Die Expression der Transposons *Dell*, *T1*, *PttA*, *Tal-1* und *En/Spm* ist in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* im Vergleich zum Wildtyp reduziert. In der Linie *35S*::SUVH2as#21* und in der Mutante *suvh2* sind diese Transposon gering oder gar nicht in ihrer Transkription verändert (Abb. 15).

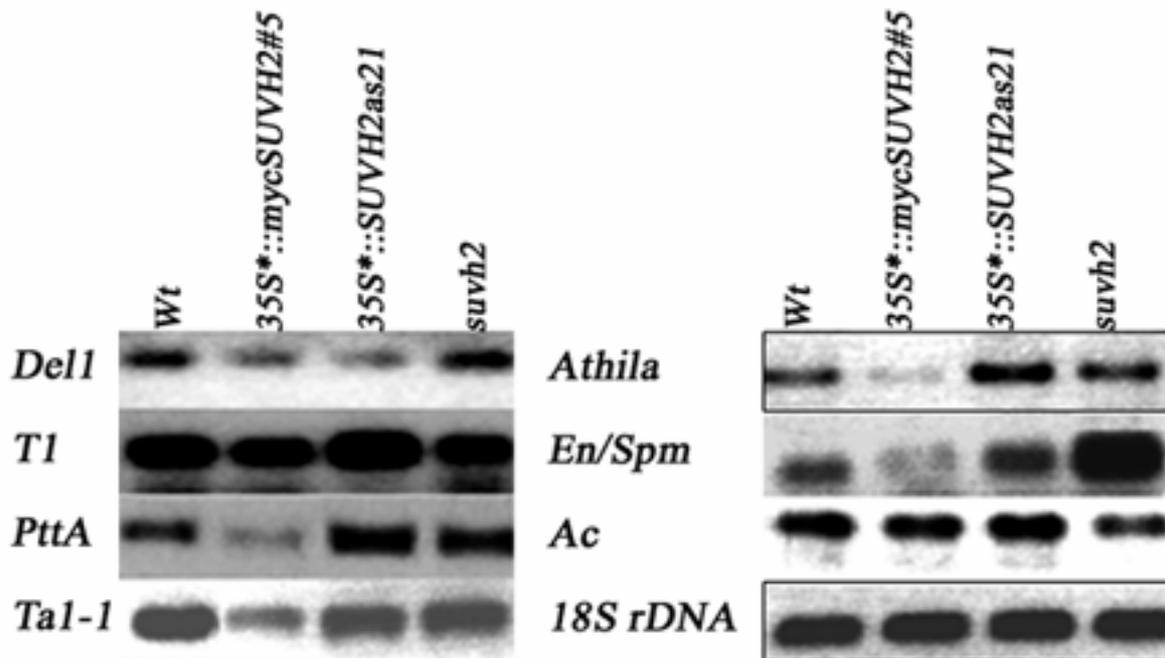


Abbildung 15: Einfluss von *SUVH2* auf die Expression verschiedener mobiler Elemente. Die Analyse verschiedener Transkripte von Transposons erfolgte mittels RT-PCR. Als Proben wurde die RNA des Wildtyps und der Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as21* und *suvh2* eingesetzt. In der Überexpressionslinie *SUVH2* ist die Expression der meisten Transposons reduziert. Die Transkription des Transposons *Ac* blieb in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as21* und *suvh2* unverändert.

Für das Transposon *Dell* konnte eine reduzierte Expression in den Linien *35S*::mycSUVH2#5* und *35S*::SUVH2as#21* gezeigt werden, während in der *suvh2*-Mutante eine erhöhte Transkriptmenge bestimmt wurde. Die Expression des Transposons *Tal-1* war in der Überexpressionslinie 5 um das 18 fache reduziert. Im Vergleich zum Wildtyp wurde in der Nullmutante *suvh2* und in der Linie *35S*::SUVH2as#21* keine Änderung der Expression festgestellt (Abb. 15).

Die Expression der DNA Transposons *En/Spm* und *PttA* wurde in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* reduziert. In der Linie *35S*::SUVH2as21* und in der Linie *suvh2* konnte eine erhöhte Transkriptmenge festgestellt werden. Vor allem in der Mutante *suvh2* war die Expression von *En/Spm* stark erhöht.

Das AC Transposon zeigte in keiner Linie eine Veränderung der Expression.

Eine reduzierte Expression konnte für das Transposon *T1* in den Proben *35S*::mycSUVH2#5* und *suvh2* nachgewiesen werden, während die Expression in der Linie *35S*::SUVH2as21* unverändert blieb.

3.3.3 Einfluss von SUVH2 auf die Expression pflanzlicher Resistenz (R)-Gene

Mit Hilfe des Affymetrix cDNA Expressionschips konnten einige reduziert expremierte Gene identifiziert werden, die bei der Pathogenabwehr der Pflanze eine Rolle spielen.

In Folge wurde die Änderung der Expression einiger dieser Gene in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as#21* und *suvh2* untersucht (Abb. 16A). In der Linie *suvh2* konnte kein Transkript von *SUVH2* nachgewiesen werden, während in der Linie *35S*::SUVH2as#21* eine reduzierte Menge an *SUVH2* vorlag. Die Expressionswerte des Wildtyps wurden als Standard verwendet. In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurden insgesamt 45 Gene *down*-reguliert und 8 Gene *up*-reguliert expremiert (Anhang 5.6.3). Die Expressionsveränderung einiger dieser Gene wurde mittels RT-PCR untersucht (Abb. 16B).

Zu den suppremierten Genen gehören *AIG1* (Poirier et al., 1999), *RPP1-WsC* (Botella et al., 1998; Linde et al. 2004), *RPP5* (Hammond-Kosak and Parker, 2003), *EDS1* (Parker et al., 1996; Parker et al., 1997), *RPS4* (Kwon et al., 2004; Zhang et al., 2002), *Hcr9-9A* (Panter et al., 2002), *Cf-2.1* (Rooney et al., 2005) und das Cf-2 ähnliche Protein *Hcr2- 5b* (Dixon et al., 2000, Review).

RPS4 verleiht Resistenz gegen den *Pseudomonas syringae* Faktor *avrRps4* und es gehört zu der Familie der TIR-NBS-LRR Resistenzproteine (*Toll Interleukin1 Receptor–Nucleotide Binding Site–Leucine Rich Repeat*; Zhang et al., 2002). Zu der Familie der TIR-NBS-LRR Resistenzproteine gehört auch die Gruppe der RPP1 und der RPP5 Proteine (Botella et al., 1998; van der Biezen et al., 2002). Die Produkte dieser Resistenz Gene interagieren direkt oder indirekt mit Wirts- oder Virus- kodierenden Faktoren (Goldbach et al., 2003). Avr2 bindet und inhibiert Rcr3, während der Komplex Rcr3-Avr2 befähigt ist das Protein Cf-2 zu aktivieren (HR; Dixon et al., 2000, Review).

Pflanzen erkennen und reagieren schnell durch die Induktion einer Abwehrantwort (*hypersensitive Antwort HR*) auf Phytopathogene.

Aus der HR resultiert ein lokalisierter Zell- und Gewebetod (Baker et al., 1997).

Die Phytopathogenen *Avr* fungieren als Liganden und die Wirt *R* Produkte als Rezeptoren. Diese Interaktion führt zu einer Resistenz bzw. zu Krankheit.

Neben den Genen *RPP1*, *RPP5*, *Hcr2*, *Hcr9*, *Cf2.1*, *EDS1* wurde auch das Gen *SDE3* in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* supplemiert (Willmann et al., 2001, Abb.16). *SDE3* kodiert eine RNA-Helikase, die in *Arabidopsis* für *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) benötigt wird (Dalmay et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass *SDE3* für die Aufrechterhaltung, nicht aber für die Initiation des TRV- *Silencing* (*Tobacco Rattle Virus*) verantwortlich ist.

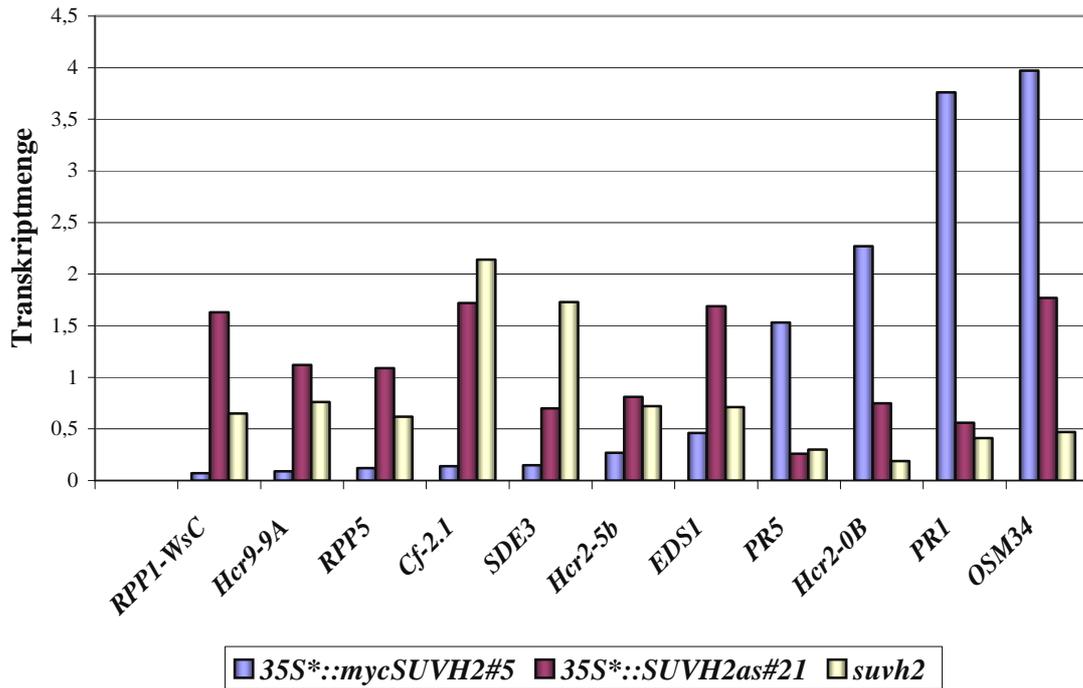
Neben diesen spezifischen Genen wurden auch unspezifische Stressgene, wie *HSP100* (CC-NBS-LRR-Protein) und *USP* (*Universal Stress Protein*, At3g25930) reduziert exprimiert. In *Arabidopsis* wurden ca. 44 *USP*-Proteine identifiziert (Kerk et al. 2003). Diese Proteine weisen eine starke Ähnlichkeit zu den *USPA* (*Universal Stress Protein A*) aus *Escherichia coli* auf, welche Proteinkinase-Funktionen besitzen.

Die Gene *Hcr2-OB*, *OSM34* (Osmotin) und die *Pathogenesis-Related Gene* *PR1* und *PR5* wurden in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* überexprimiert (Abb. 16A). Die PR-Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht geordnet, wobei die PR1-Familie (15-17kDa) vor allem saure Proteine enthält, während die Familie PR5 zu den Thaumatin ähnlichen Proteinen zählt. Zu dieser Familie gehören auch die Osmotin Proteine (Hu et al., 1997; Weigel et al. 2005).

Die Expression der PR-Gene vermittelt in der Pflanze die systemische Resistenz (*SAR*, *Systemic Acquired Resistance*; Wang et al., 2005). Die lokale HR Antwort wird durch nicht spezifische Resistenz innerhalb der Pflanze unterstützt, dieses Phänomen ist als systemische Resistenz (*Systemic Acquired Resistance SAR*) bekannt

Die HR und die SAR ist abhängig von der Interaktion zwischen dem dominanten oder semi-dominanten Resistenz (*R*)-Genprodukt in der Pflanze und einem korrespondierendem dominanten Phytopathogen Avirulenz (*Avr*)-Genprodukt (Baker et al., 1997).

A



B

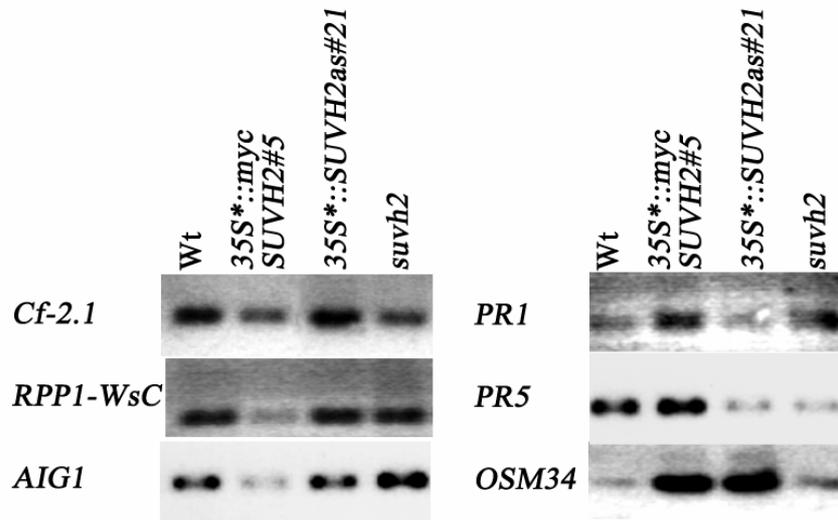


Abbildung 16: Die veränderte Expression einiger pflanzlicher Resistenz (R)-Gene konnte in den Linien 35S*::mycSUVH2#5, 35S*::SUVH2as#21 und suvh2 mittels des Affymetrix DNA Expressionschip und semiquantitativer PCR nachgewiesen werden. (A) Mit Hilfe des Expressionschips konnte eine Änderung der Expression für die Gene RPP1-WsC, Hcr9-9A, RPP5, Cf-2.1, SDE3, Hcr2-5b, EDS1, PR5, Hcr2-0B, PR1 und OSM34 gezeigt werden. (B) In der Linie 35S*::mycSUVH2#5 wurden für die Gene Cf-2.1, RPP1-WsC und AIG1 eine reduzierte Expression und für Gene PR1, PR5 und OSM34 eine erhöhte Expression mittels RT-PCR nachgewiesen.

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR wurde in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* die reduziert expremierten Gene *Cf-2.1*, *RPP1-WsC* und *AIG1* überprüft (Abb. 16B). In den Linien *35S*::SUVHas#21* und *suvh2* konnten für diese Gene, eine unveränderte oder eine leicht erhöhte Expression nachgewiesen werden. Diese PCR-Daten stimmen mit den Daten aus dem Expressionschip überein.

Des weiteren wurden die Gene *PR1* (Wang et al., 2005), *PR5* und *OSM34* (Hu et al. 1997) in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVHas#21* und *suvh2* getestet. In der Überexpressionslinie #5 wurden die Gene *PR1*, *PR5* und *OSM34* im Vergleich zum Wildtyp erhöht expremiert, während die Expression von *PR1* und *PR5* in den Linien *35S*::SUVHas#21* und *suvh2* reduziert wurde. Der Nachweis einer erhöhten Expression des Gen *OSM34* erfolgte nur in den Linien *35S*::mycSUVH2#5* und *35S*::SUVHas#21* (Abb. 16B). In der Linie *suvh2* blieb die Expression unverändert.

3.4 Einfluss von *SUVH2* auf *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*

3.4.1 Dosis abhängiger Effekt von *SUVH2* auf das *Silencing* von *LUC*

3.4.1.1 Die Überexpression von *SUVH2* verstärkt das *Silencing* des Reportergens *LUZIFERASE (LUC)*

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von *SUVH2* auf Transgen *Silencing* untersucht. In diesem Test wurde die partiell stillgelegte Linie *35S::LUC2* verwendet (durch Herrn I. Hofmann etabliert, 2004). Das Protein *LUZIFERASE* aus *Photinus pyralis* nutzt eine biolumineszente Enzym/Substrat-Reaktion, in der das Substrat Luziferin ATP-abhängig oxidativ dekarboxyliert wird. Dies führt zu einer Lichtemission, die messbar ist. Die Überexpressionslinien *35S*::mycSUVH2#4* und *35S*::mycSUVH2#6/+* wurden mit der homozygote Linie *35S::LUC2* gekreuzt (Abb. 17). Die resultierenden F1-Generationen wiesen die Genotypen *35S*::mycSUVH2#4/+* ; *35S::LUC2/+* oder *35S*::mycSUVH2#6/+* ; *35S::LUC2/+* auf. Die Selektion der Samen der F1-Generation erfolgte auf Kanamycin. Infolge wurde ihre *LUZIFERASE* Aktivität gemessen. Ihre Genotypisierung erfolgte über PCR, wobei die Anwesenheit des Reportergens *LUC* und des Transgens *mycSUVH2* überprüft wurde. Für die Genotypisierung wurden die *LUC*-Primer *Lu8f/Lu1626b* und die Transgenspezifischen Primer *mycSal/Su2-1631B* verwendet.

Die Pflanzen der F1-Generationen mit den Genotypen $35S^{*}::mycSUVH2\#4/+;35S::LUC2/+$ oder $35S^{*}::mycSUVH2\#6/+;35S::LUC2/+$ zeigten durch die Überexpression von SUVH2, eine Inaktivierung des Reportergens *LUC*. Diese F1-Pflanzen $35S^{*}::mycSUVH2\#4/+;35S::LUC2/+$ und $35S^{*}::mycSUVH2\#6/+;35S::LUC2/+$ wurden in *Arabidopsis thaliana* gekreuzt.

In der daraus resultierenden BC1-Generation wurden die Pflanzen genotypisiert und die Aktivität ihrer *LUC* gemessen. Die $35S::LUC2/+$ Pflanzen der BC1-Generation zeigten trotz Abwesenheit des *mycSUVH2*-Transkriptes eine reduzierte Aktivität (Abb. 17).

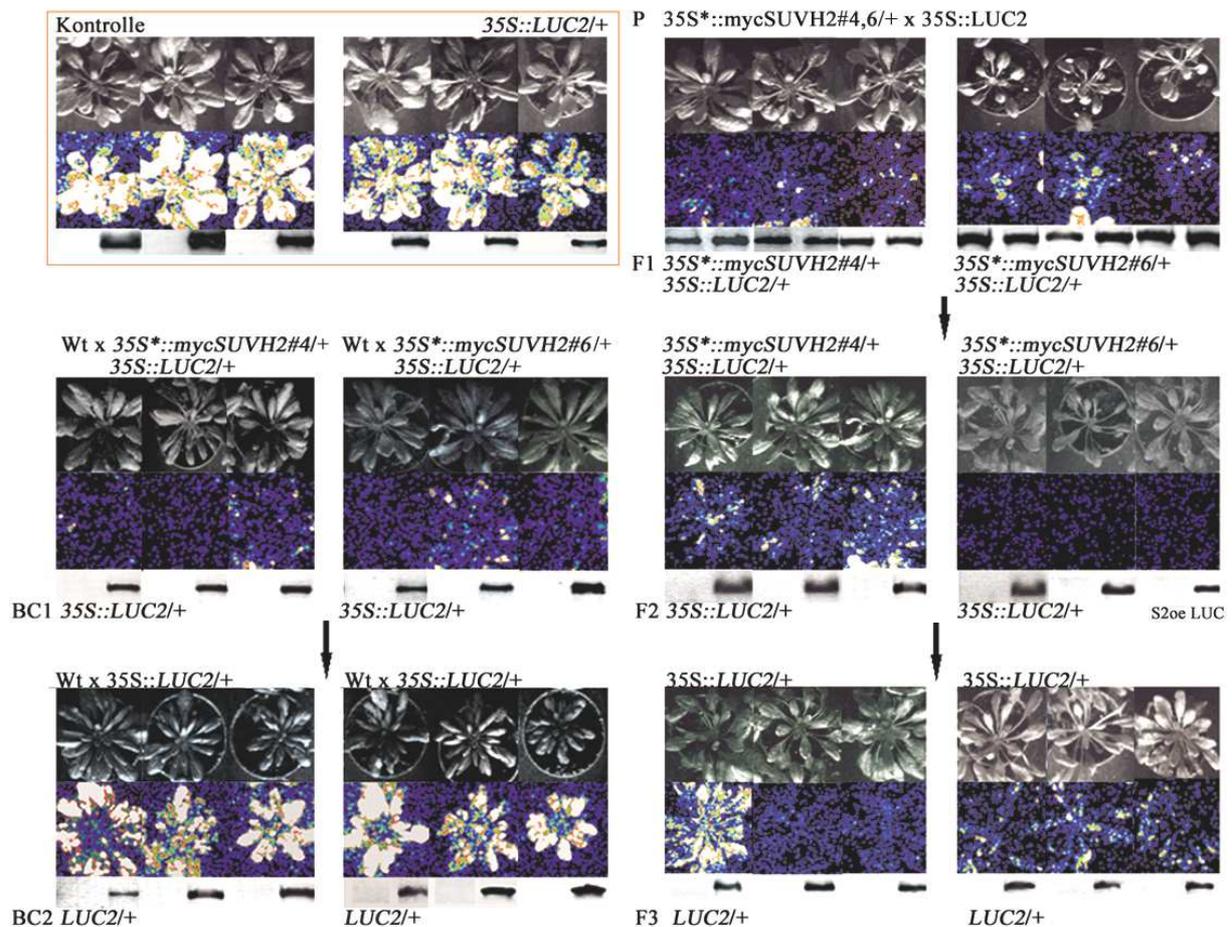


Abbildung 17: Überexpression von SUVH2 verstärkt den TGS des Reportergens *LUZIFERASE*. Die Kreuzung der *SUVH2*-Überexpressionslinien #4 und #6 erfolgte auf die homozygote Linie *LUC2*. In den Generationen F1, F2, F3 und in der Rückkreuzung BC1 kommt es zu einer reduzierten Aktivität der *LUC*. In der F1 Generation erfolgt eine Verstärkung der Inaktivierung, diese blieb in den Generationen F2 und F3 mit dem Genotyp *LUC2/+* erhalten, wobei in der Generation F3 eine leichte *LUC* Aktivierung erfolgt. Die Aktivität der Kontrollpflanzen wird jedoch nicht erreicht. In der Kreuzungsgeneration BC1 ohne *SUVH2*-Überexpression blieb die Aktivität reduziert, während die *LUZIFERASE* in der Generation BC2 die gleiche Aktivität aufwies, wie in den Kontrollpflanzen.

Die reduzierte Aktivität des Reporters LUC in der BC1-Generation war unabhängig von der *35S*::mycSUVH2* Ausgangslinie.

Die *35S::LUC2/+* Pflanzen der BC1-Generation wurden erneut in den Wildtyp gekreuzt. In dieser BC2-Generation erfolgte eine Reaktivierung der LUZIFERASE (Abb. 17). Sie entspricht der Aktivität in den Kontrollpflanzen *35S::LUC2/+*. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die LUZIFERASE Aktivität in den direkten Nachkommen der F1-Generation untersucht.

Die F2-Generation der Kreuzung wurde mittels PCR genotypisiert. Die Pflanzen mit dem Genotyp *35S::LUC2/+* zeigten trotz fehlender *mycSUVH2* Expression ein stabiles *Silencing* der LUZIFERASE (Abb. 17).

In der F2-Generation der Kreuzung *35S*::mycSUVH2#6/+* x *35S::LUC2* konnte keine Aktivität von LUC nachgewiesen werden, während die Nachkommen der Kreuzung *35S*::mycSUVH2#4/+* x *35S::LUC2* eine geringe Aktivität des Reporters aufwiesen.

Die Samen der F2-Generation mit dem Genotyp *35S::LUC2/+* wurden über Kanamycin selektiert und die Pflanzen der F3-Generation mittels PCR genotypisiert. In der F3-Generation wurde erneut die Aktivität der Luziferase getestet (Abb. 17). Die F3-Nachkommen der Kreuzung *35S*::mycSUVH2#6/+* x *35S::LUC2* zeigten eine geringe Reaktivierung der LUZIFERASE, während in der F3-Generation der Kreuzung *35S*::mycSUVH2#4/+* x *35S::LUC2* bei einer von 32 F3-Pflanzen eine stärkere Reaktivierung der Luziferase beobachtet werden konnte (Abb. 17). Die meisten F3-Nachkommen mit dem Genotyp *35S::LUC2/+* zeigten keine Reaktivierung der LUZIFERASE.

3.4.1.2 Die Reduktion des endogenen *SUVH2* verstärkt die Aktivität des Reporters LUZIFERASE

Die homozygote Linie *35S*::SUVH2as#11* wurde mit der homozygoten Linie *35S::LUC2* gekreuzt. In ihren Nachkommen erfolgte die Analyse der LUZIFERASE Aktivität. Die F1-Generation mit dem Genotyp *35S*::SUVH2as#11/+; 35S::LUC2/+* zeigte eine erhöhte Aktivität des Reporters LUC (Abb. 18).

Die F1-Pflanzen wurden in *Arabidopsis thaliana* ausgekreuzt. Die daraus resultierende BC1-Generation wurde zunächst auf ihre LUZIFERASE Aktivität geprüft und ihr Genotyp wurde über PCR ermittelt. Für die PCR wurden die Primerpaarungen *Lu8F/Lu1626b* und *HindIII/Su2-1290F* verwendet.

Die BC1-Generation der Kreuzung $35S^{*}::SUVH2as/+$; $35S::LUC2/+$ und $35S::LUC2/+$ zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte LUZIFERASE Aktivität, unabhängig von der Anwesenheit der T-DNA $35S^{*}::SUVH2as$.

Die Pflanzen der BC1-Generation mit dem Genotyp $35S::LUC2/+$ wurden erneut in *Arabidopsis thaliana* gekreuzt. Eine Analyse der Aktivität des Reporters und ihre Genotypisierung erfolgten in der resultierenden BC2-Generation. Die BC2-Generation der Kreuzung zeigte die gleiche LUZIFERASE Aktivität, wie die Kontrollpflanzen $35S::LUC2/+$ (Abb. 18).

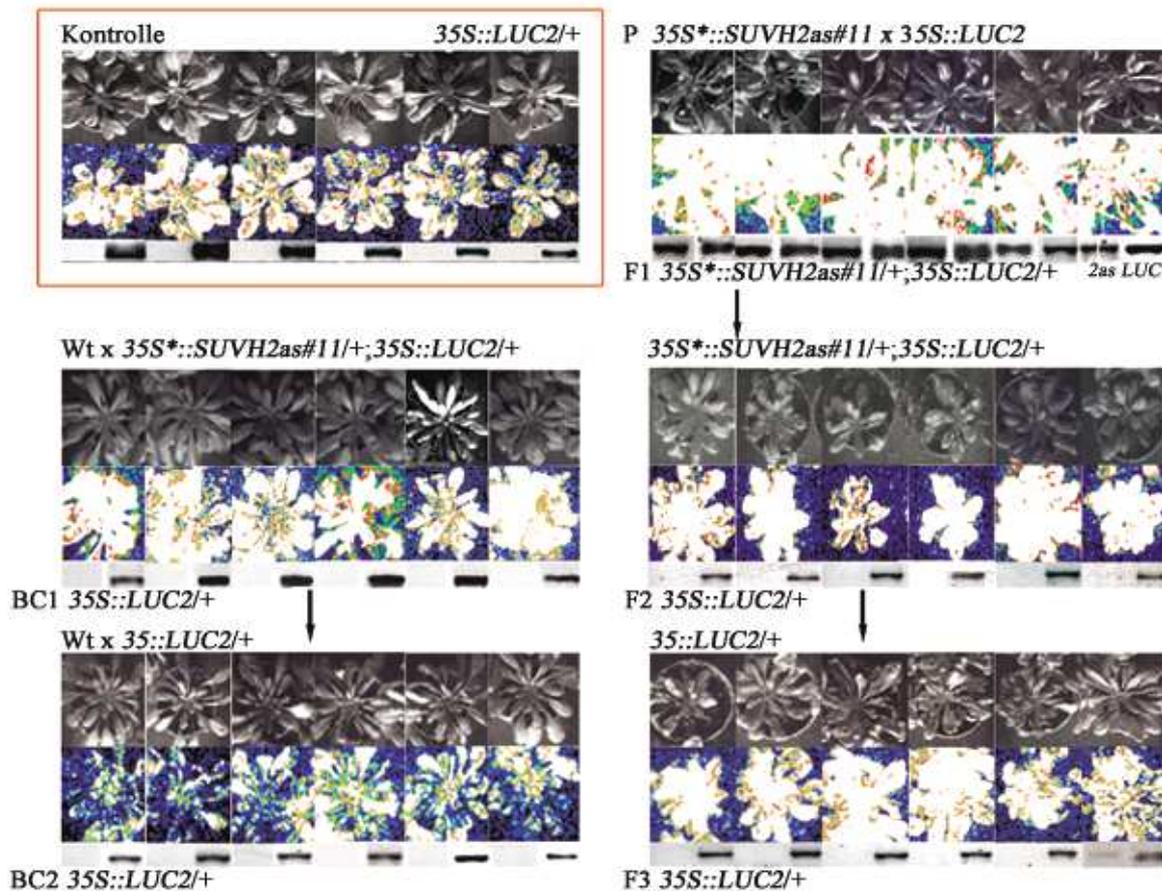


Abbildung 18: Die *SUVH2*-Antisenselinie #11 verstärkt die LUZIFERASE Aktivität der Linie $35S::LUC2/+$. Die Nachkommen der Kreuzung, einschließlich der F1-Generation, der Rückkreuzung BC1 und der Generationen F2 und F3, zeigten eine stärkere LUZIFERASE Aktivität als die Kontrollpflanzen $35S::LUC2/+$. In der Generation BC2 erfolgte eine Wiederherstellung der LUZIFERASE Aktivität der Kontrollpflanzen.

Aufgrund dieses Resultats wurde die Aktivität von LUC in den Nachkommen der F1-Generation untersucht. Die F2- und F3-Generationen mit dem Genotyp $35S::LUC2/+$ zeigten im Vergleich zur Kontrolle $35S::LUC2/+$ eine erhöhte Aktivität der LUZIFERASE (Abb. 18).

Es wurden keine Unterschiede in der Aktivität des Reporters zwischen den Pflanzen-Genotypen *35S*::SUVH2as/+*; *35S::LUC2/+* und *35S::LUC2/+* detektiert. Die höhere Aktivität wurde in hemizygoten Pflanzen mit und ohne T-DNA *35S*::SUVH2as* gefunden. Die Aktivität der LUZIFERASE in der F2-Generation entsprach der Aktivität in der F1-Generation. Es folgte die Untersuchung der LUZIFERASE Aktivität in der F3-Generation. Hierfür wurden die Nachkommen der F2-Generation mit dem Genotyp *35S::LUC2/+* verwendet. In der F3-Generation wurde eine höhere LUZIFERASE Aktivität als in der Kontrolle beobachtet (Abb.18).

SUVH2 hat einen Dosis abhängigen Effekt auf das *Transcriptional Gene Silencing*. Die Überexpression von SUVH2 verstärkt die Inaktivierung der partiell stillgelegten Linie *35S::LUC*. Dieses verstärkte *Silencing* wurde in den Generationen BC1, F2 und F3 stabil weiter vererbt. Die Reduktion des endogenen SUVH2 führt zu einer höheren Aktivität der LUZIFERASE, dies blieb in der BC1-Generation und in den Generationen F2 und F3 stabil.

3.4.2. Einfluss der *ddm1-2* Mutante auf die Ausprägung des "mini-Pflanzen“-Phänotyps

Für die Untersuchung des Einflusses von *ddm1-2* auf den "mini-Pflanzen“-Phänotyp wurde die Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#6* und die *ddm1-2* Mutante (Vongs et al., 1993) gekreuzt. Für die *ddm1-2* Mutante ist kein Phänotyp beschrieben. Das Protein DDM1 zeigt eine Homologie zum *SWI2/SNF2-remodelling* Faktor aus Hefe. DDM1 wird benötigt für die Aufrechterhaltung der DNA Methylierung bzw. für das *Silencing* in *Arabidopsis thaliana* an bestimmten Loci. Dieser Effekt wurde für Transposons (Hirochika et al., 2000; Kato et al., 2004), für *PAI2* (Jeddeloh et al., 1998), für rDNA (Mathieu et al., 2003) und für die Zentromerregion (180bp-Sequenz, Mittelsten Scheid et al., 1998) beschrieben. *ddm1-2* Mutanten zeigten eine Dekondensation der Chromozentren (Okamoto et al., 2001). Das Allel *ddm1-2* enthält einen Basenpaaraustausch (*Transition*) von Guanin zu Adenin an der *Splice-Donor-Site* des 11. Introns, welches zur Verwendung einer alternativen *Splice-Donor-Site* führt. Diese befindet sich 56bp *Upstream* im Exon 11 (Jeddeloh et al., 1999). Dieser Defekt führt zu einer Deletion, zu einem Frameshift und zu einer vorzeitigen Termination der Translation. Daraus resultiert eine Mutation an der Restriktionsschnittstelle *RsaI*, welche für die Genotypisierung der Kreuzung genutzt wurde (Vongs et al., 1993). Mit Hilfe dieser Mutation ist es möglich, das Allel *ddm1-2* zu identifizieren und über PCR nachzuweisen (Abb. 19B).

Die hemizygoten $35S^{*}::mycSUVH2\#6/+$ wurde mit der homozygoten $ddm1-2$ Mutante gekreuzt. Die Überexpressionslinie #6 zeigt einen „mini-Pflanzen“ Phänotyp. In dieser Kreuzung wird der Einfluss von der $ddm1-2$ Mutanten auf den Phänotyp der Überexpressionslinie #6 untersucht. In der F1-Generation zeigten die Pflanzen durch das hemizygoten $ddm1-2$ Allel einen reduzierten "mini-Pflanzen" Phänotyp der Linie $35S^{*}::mycSUVH2\#6$. Die Nachkommen der Pflanzen, mit dem Genotyp $ddm1-2/DDM1$; $35S^{*}::mycSUVH2\#6/+$, wurden in der F2-Generation der Kreuzung zunächst genotypisiert. Es erfolgte der Nachweis des transgenen $mycSUVH2$ und der Mutante $ddm1-2$ (Abb. 19).

A SUVH2 - DDM1 Interaktion

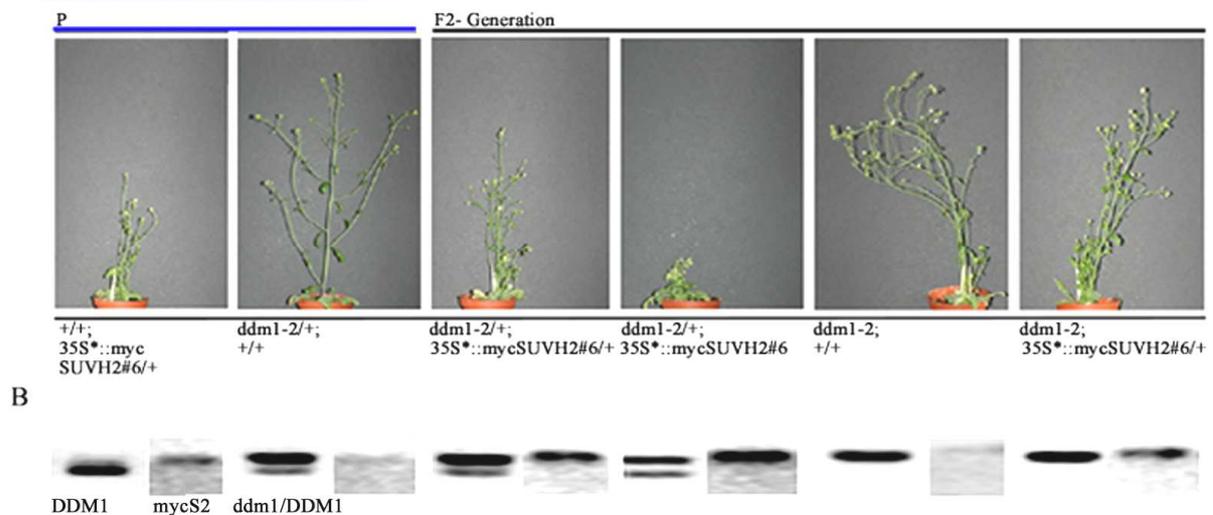


Abbildung 19: Interaktion zwischen SUVH2 und DDM1. (A) In der F2-Generation der Kreuzung erfolgte eine Reduktion des „mini“ Pflanzenphänotyps durch die $ddm1-2$ Mutante. (B) In der F2-Generation erfolgte der Nachweis des transgenen $mycSUVH2$ und der Nachweis der homo- bzw. hemizygoten $ddm1-2$ Allele.

In den homozygoten und heterozygoten $ddm1-2$ Mutanten kommt es gleichermaßen zu einer Suppression des "mini-Pflanzen" Phänotyps, wenn $35S^{*}::mycSUVH2\#6$ hemizygot vorliegt. Die Nachkommen mit dem Genotyp $ddm1-2/+; 35S^{*}::mycSUVH2\#6$ weisen, wie die Linie $35S^{*}::mycSUVH2\#6/+$, einen „mini-Pflanzen“ Phänotyp auf. Die Ausprägung des „mini-Pflanzen“ Phänotyps könnte ein dosisabhängiger Prozess sein, der durch Überexpression von $SUVH2$ etabliert wird. In der Linie $ddm1-2/+; 35S^{*}::mycSUVH2\#6$ wurde dieser Schwellenwert überschritten, welcher zur Ausbildung des Phänotyps führt.

Der "mini-Pflanzen" Phänotyp der $SUVH2$ -Überexpressionspflanzen wird in der Mutante $ddm1-2$ supprimiert.

3.5 Molekulare und funktionelle Analyse der Domänen von SUVH2

Die Funktionen der verschiedenen Domänen des Proteins SUVH2 wurden mittels EMS-Mutagenisierung untersucht. Für die molekulare Analyse von SUVH2 wurden Samen der Linie *35S*::mycSUVH2#5* chemisch mutagenisiert. Die Kanamycin resistenten Keimlinge der M1-Generation wurden auf normal ausgebildete Kotyledonen selektiert (Abb. 20A).

Nach diesem Selektionsparameter wurden nur dominante Mutanten des „mini-Pflanzen“ Phänotyps isoliert.

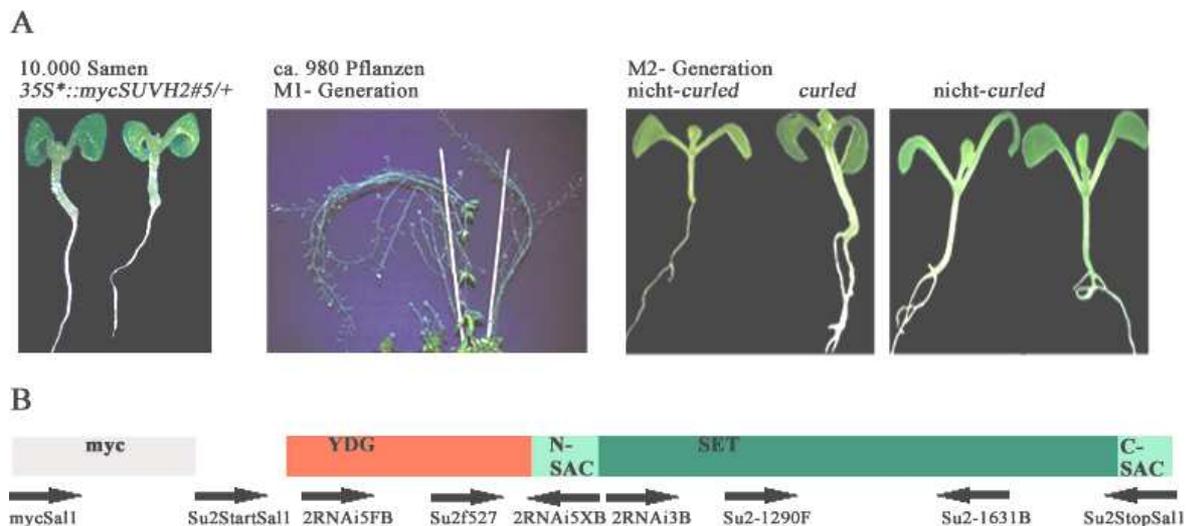


Abbildung 20: Darstellung der EMS Mutagenese. (A) Die Selektion der Pflanzen erfolgte mittels des fehlenden „mini-Pflanzen“ Phänotyps unter zur Hilfenahme der Kanamycin Resistenz, der nicht-curl'd Kotyledonen und Blätter, sowie der Ausprägung des Normalwuchses. (B) Die Darstellung des transgenen *mycSUVH2* mit den für die Lokalisierung der Mutation verwendeten Primern.

Es konnten 981 putative Mutanten in der M1-Generation isoliert werden, welche keine *curl'd* Kotyledonen und keinen „mini-Pflanzen“ Phänotyp aufwiesen. Die aus der M1-Generation resultierenden M2-Pflanzen wurden auf Kanamycin Resistenz getestet und der Phänotyp ihrer Kotyledonen wurde untersucht. In der M2-Generation konnten zwei Typen identifiziert werden.

Im Typ 1 spalteten sich die Keimlinge in nicht-*curl'd* und *curl'd* Kotyledonen auf (Abb. 20A). In diesem Fall befand sich die Mutation in einen unbekanntem Suppressoren für den „mini- Pflanzen“ Phänotyp. Im Typ 2 zeigten alle Keimlinge keine *curl'd* Kotyledonen, die Mutation erfolgte hier im transgenen *mycSUVH2*. Es konnten ca. 90 Typ 2-Linien und ca. 200 Typ 1-Linien identifiziert werden. Für die funktionelle Charakterisierung von SUVH2 wurden ausschließlich Typ 2-Mutanten verwendet.

In diesen Linien ist das transgene *mycSUVH2* mutiert. Diese Mutation führt zu einem normalen Wachstum der Pflanzen. Aus diesen Mutanten wurde genomische DNA isoliert und das Transgen *mycSUVH2* über PCR mit den Primern *mycSal/Su2-StopSalI* amplifiziert (Abb. 20B). Mit Hilfe der Sequenzierung konnte die Mutation innerhalb des *mycSUVH2* bestimmt werden (Abb. 20B).

Durch die Mutagenese mit EMS erfolgte eine Ethylierung der DNA, was zu einer Fehlpaarung führt. Durch die EMS-Behandlung traten neben Punktmutationen auch *frameshift*-Mutationen auf. Diese wurden mit Hilfe der Sequenzierung identifiziert und ihre Position innerhalb des Gens *mycSUVH2* genau ermittelt (Abb. 21A, Anhang 5.5).

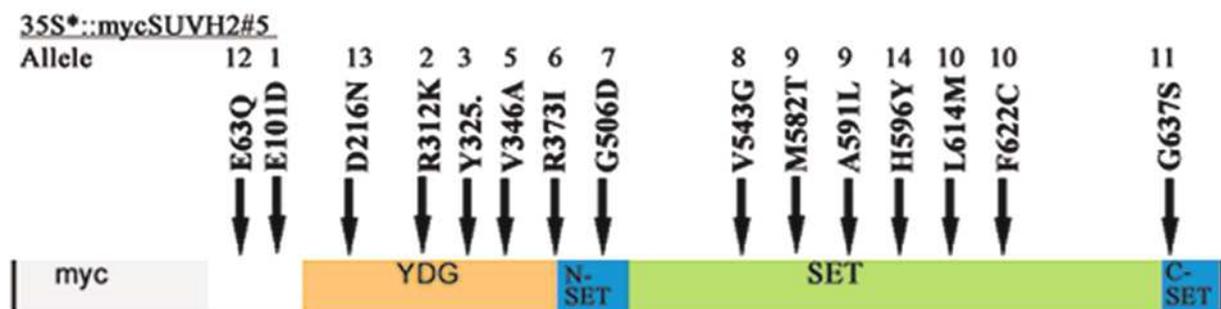
In 15 Linien wurde die Mutation im transgenen *mycSUVH2* nachgewiesen. Vier der 15 Linien haben einen Aminosäureaustausch im 5'-Bereich der YDG-Domäne. Die Allele #5+2 bis #5+5 und #5+13 enthalten eine Mutation in der YDG-Domäne (Abb. 21A, Anhang 5.5).

Das Allel #5+3 weist einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Stop auf. Die Linie #5+4 besitzt eine Frameshift Mutation. Die anderen 3 Mutanten (#5+2, #5+5, #5+13) haben einen Aminosäureaustausch. In 7 Linien wurde die Mutation in der SET-Domäne bzw. pre-SET oder post-SET Domäne lokalisiert. Alle Linien weisen einen Aminosäureaustausch auf (Abb.21A). Für zwei Allele der SET-Domänen Mutanten (#5+9, #5+10) konnten jeweils zwei Aminosäureaustausche lokalisiert werden.

In den Allelen #5+1 bis #5+10 wurde die Transkriptmenge von *mycSUVH2* im Vergleich zu Wildtyp und der Ausgangslinie *35S*::mycSUVH2#5* bestimmt, wobei die Linie *35S*::mycSUVH2#5* als Kontrolle diente (Abb. 21B, Anhang 5.5).

AKTIN wurde als Normalisierungsgen verwendet. Die Werte der *AKTIN* PCR wurden 1 gesetzt und die Werte der PCR's von *SUVH1* und *SUVH2* wurden mit dem *AKTIN* Wert normalisiert.

A



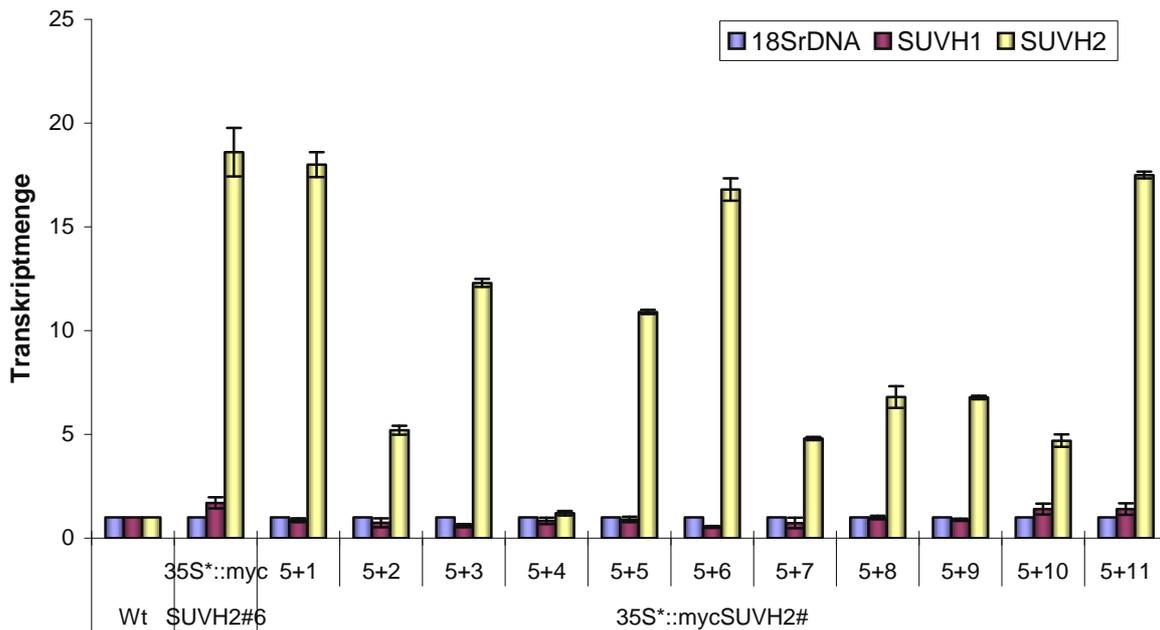
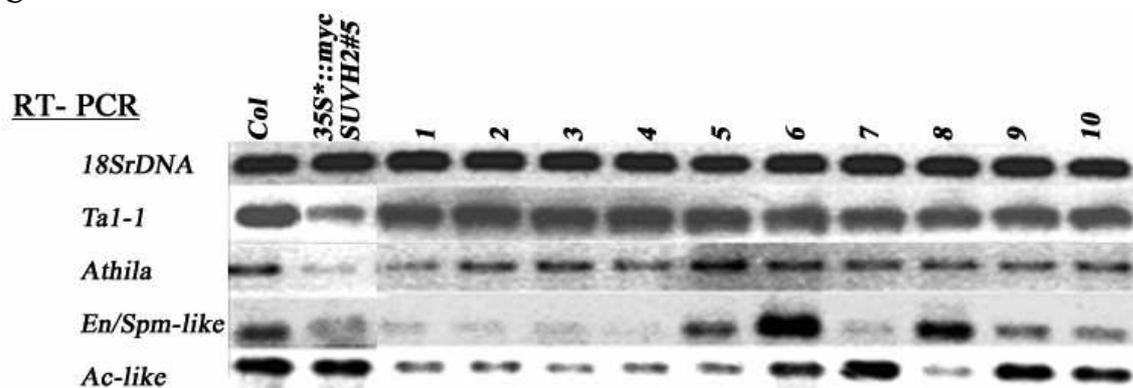
B**C**

Abbildung 21: Die durch EMS Mutagenese erhaltenen Allele der Linie *35S*::mycSUVH2#5*. (A) Die Lokalisierung der Mutation im *mycSUVH2* erfolgte mittels Sequenzierung. Die strukturelle Darstellung der Mutationen, einschließlich der Angabe der Position und des Aminosäureaustausches. (B) Der Nachweis der erhöhten Expression von *SUVH2* erfolgte in den Allelen *35S*::mycSUVH2#5+1* bis *#5+3* und *#5+5* bis *#5+11* mittels *Real Time PCR*. (C) In der semiquantitativen PCR konnte keine reduzierte Expression von *Ta1-1* und *Athila* in den Mutanten mehr nachweisen werden. Die einzige Ausnahme war die Transkription für *ATHILA* im Allel *#5+1* und *#5+4*. Das Transposon *En/Spm* wurde in allen Allelen der Linie *#5* außer in *#5+5*, *#5+6* und *#5+8* reduziert expremiert.

Dieser Nachweis ist wichtig für die Aussage, ob der nicht ausgeprägte „mini-Pflanzen“ Phänotyp durch die Mutation im Transgen hervorgerufen wird, oder durch die geringere Menge an *mycSUVH2*-Transkript.

Die Transkriptmenge wurde in einer *Real Time*-PCR mit den Primern *mycSal1/Su2-545r* geprüft (Abb. 21B). Außer im Allel #5+4 konnten in allen anderen Allelen eine erhöhte Transkriptmenge an *SUVH2* nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde neben der Transkription des Gens *SUVH2* auch die Transkription verschiedener Transposons überprüft (Abb. 21C). Als Kontrolle der eingesetzten cDNA Menge diente die *18S rDNA*. Die Expression des Transposons *TAI-1* in den Allelen #5+1 bis #5+10 entsprach der Expression im Wildtyp, während *TAI-1* in der Kontrolle *35S*::myc SUVH2#5* reduziert expremiert wurde. Das Transposon *ATHILA* wurde in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* und im Allel #5+1 reduziert expremiert. Alle anderen EMS-Mutanten zeigten eine stärkere Expression des Transposons *ATHILA* als die Ausgangslinie #5, wobei die Expression in den YDG-Domänen Mutanten und in den SET-Domänen Mutanten annähernd wieder Wildtypniveau erreichten. Das Transposon *En/Spm* wurde in den Allelen #5+5, #5+6 und #5+8 bis #5+10 stärker expremiert als in der Kontrolle *35S*::mycSUVH2#5*. Dies könnte darauf hinweisen, dass dieser Bereich innerhalb von *SUVH2* notwendig ist für das *Silencing* des Transposons *En/Spm*. Das *AC-like* Transposon wurde in den Allelen *35S*::mycSUVH2#5+1 bis #5+5* (Mutation in der YDG-Domäne) in geringeren Mengen als in der Kontrolle *35S*::myc- SUVH2#5* expremiert. Dieses Resultat deutet an, dass diese Region notwendig ist für Spezifität der Bindung an den Zielgenen.

Die Mutationen in der YDG-Domäne führen zwar zu einer Suppression des „mini- Pflanzen“ Phänotyps aber nicht zu einer Expression der Transposons *En/Spm* und *Ac*, wie im Wildtyp. In den Mutanten der SET-Domäne entspricht die Transkriptmenge des Transposons *ATHILA* dem Wildtyp. Sie ist nicht, wie in der Kontrolle und in den YDG-Mutanten, reduziert.

3.6. Einfluss des Potyvirus *TuMV* auf die Expression der *SUVH*-Gene in *Arabidopsis thaliana*

3.6.1 Induktion von *SUVH2* bei Virus-Infektion im Wildtyp

Ausgehend von der Expressionsanalyse einiger Resistenz-Gene in den Linien *35S*::myc-SUVH2#5*, *35S*::SUVHas#21* und *suvh2* wurde die Expression der *SUVH*-Gene während einer *TuMV*-Infektion untersucht. In diesen Versuch wurden der Wildtyp und die *suvh2* SALK Mutante mit dem *Turnip Mosaik Virus* infiziert.

Das *TuMV* gehört zu den Potyviren und besitzt ein breites Wirtsspektrum, d.h. es ist in der Lage, verschiedenste Pflanzenarten zu infizieren (Dunoyer et al., 2004).

Es gehört zu den einzelsträngigen RNA Viren, dessen ca. 10 Kb langes Genom wird zunächst als ein ORF transkribiert und anschließend prozessiert (Abb. 22; Riechmann et al., 1992, Höfius, 2003).



Abbildung 22: Graphische Darstellung des Potyvirus (*TuMV*). Das Virus besitzt ein 10 Kb langes einzelsträngiges RNA-Genom. Die Orte der proteolytischen Spaltung wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Die 10 Proteine haben folgende Funktionen: Transportfunktion - VPg-Proteinase, NIa (*Nuclear Inclusion a*), HC-Pro (*Helper Component Proteinase*), CI (*Cylindrical Inclusion*), P1 und CP (*Capsid Protein*). Das HC-Pro Protein hat zusätzlich eine RNA-*Silencing* Suppressoraktivität. Das NIb Protein (*Nuclear Inclusion b*) ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und das Protein 6K2 dient als Membranverankerung für den viralen Replikationskomplex.

Das Virus nutzt für seine Vermehrung die Translationsapparatur der pflanzlichen Zelle (Diaz-Pendon et al., 2004). In der Zelle erfolgte zunächst dessen Vermehrung und im Anschluss wurde die RNA von viralem Protein umhüllt. Jetzt konnte das Virus andere Zellen und benachbarte Pflanzen befallen. Es handelt sich um eine systemische Infektion.

Für die Infektion wurde das Virus *TuMV* (V) in Kaliumphosphatpuffer gelöst und injiziert (Höfius). Für die Kontrolle (M) wurde der Phosphatpuffer verwendet (Höfius). Es wurden nach 0, 8, 10, 12 und 14 Tagen Proben entnommen und mittels semiquantitativer RT-PCR und quantitativer *Real Time* PCR analysiert.

Im Anschluss erfolgte zuerst der Nachweis des *TuMV* Virus in den Proben. Für diese PCR wurden die Primer *TuMV-F2841/TuMV-R3200* verwendet. Die Primer binden an die P3-Sequenz der viralen cDNA. Das P3-Transkript ist ein Gen, welches die hypersensitive Antwort der Pflanzenzelle auf Pathogene vermittelt. In Tabak konnte gezeigt werden, dass die Keimlinge von P3 transgenen Linien in ihrer Entwicklung gehemmt sind. Eine intrazelluläre Lokalisierung der viralen Proteine zeigte, dass P3 im Kern und im Nukleolus vorliegt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass P3 an der frühen Phase der Virus Replikation beteiligt ist (Moreno et al., 1998).

Das virale Transkript P3 konnte in Proben, welche nach 10 und 14 Tagen geerntet wurden, nachgewiesen werden. Die entnommenen Proben stammen nicht von dem inokulierten Blättern, sondern von benachbarten Blättern. In den Proben, welche nach 8 und 12 Tagen geerntet wurde, konnte die cDNA des Virus nicht nachgewiesen werden (Abb. 23).

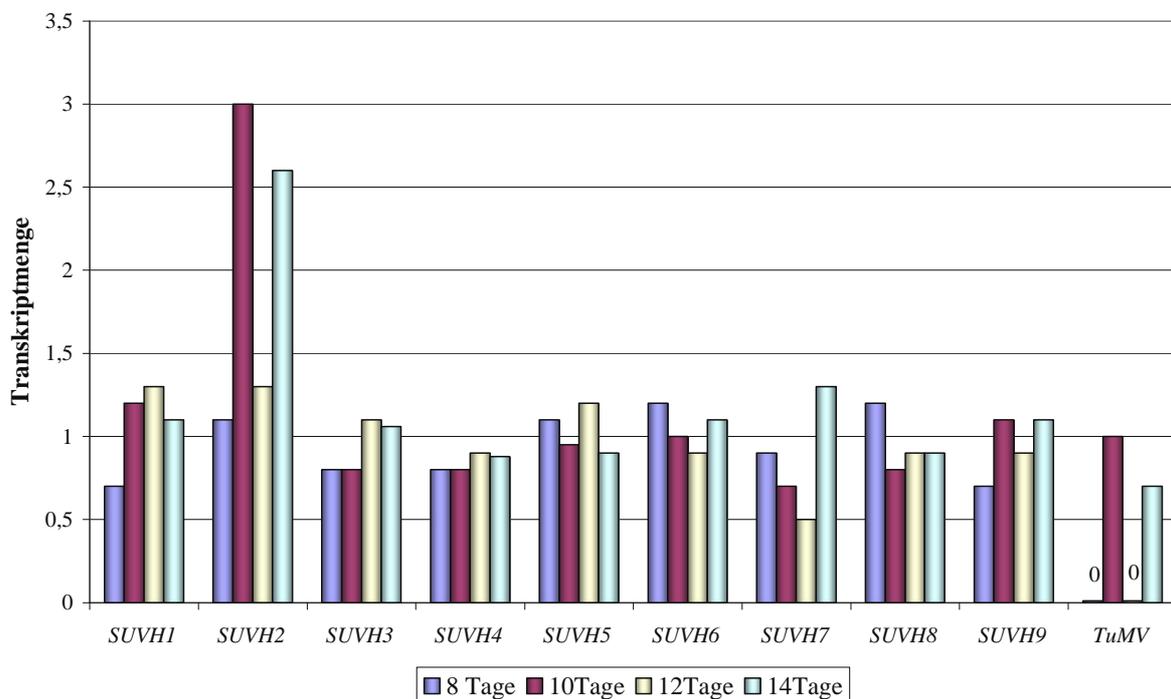
In den infizierten Proben des Wildtyps wurde die Expression der Gene *SUVH1* bis *SUVH9* untersucht.

Die Werte der Virus infizierten Proben V wurden durch die Werte der Kontrollen M dividiert (Abb. 23A). Die stärkste Änderung der Expression erfolgte für *SUVH2* in den Virus infizierten Proben nach 10 und 14 Tagen (Abb. 23A).

In der semiquantitativen RT-PCR wurde neben den Virus infizierten Proben V und der Kontrolle M, eine unbehandelte Probe (K) als weitere Kontrolle verwendet (Abb. 23B).

Im Wildtyp zeigte das Virus in der Probe, die nach 10 Tagen gesammelt wurde, eine stärkere Expression als in der Probe nach 14 Tagen. Für die Transkripte der Gene *SUVH1* und *SUVH3-SUVH9* wurden keine Veränderungen der Expression in den Proben festgestellt. Die PCR Reaktionen der *TuMV* infizierten Proben zeigten eine eindeutige Induktion von *SUVH2*.

A



B

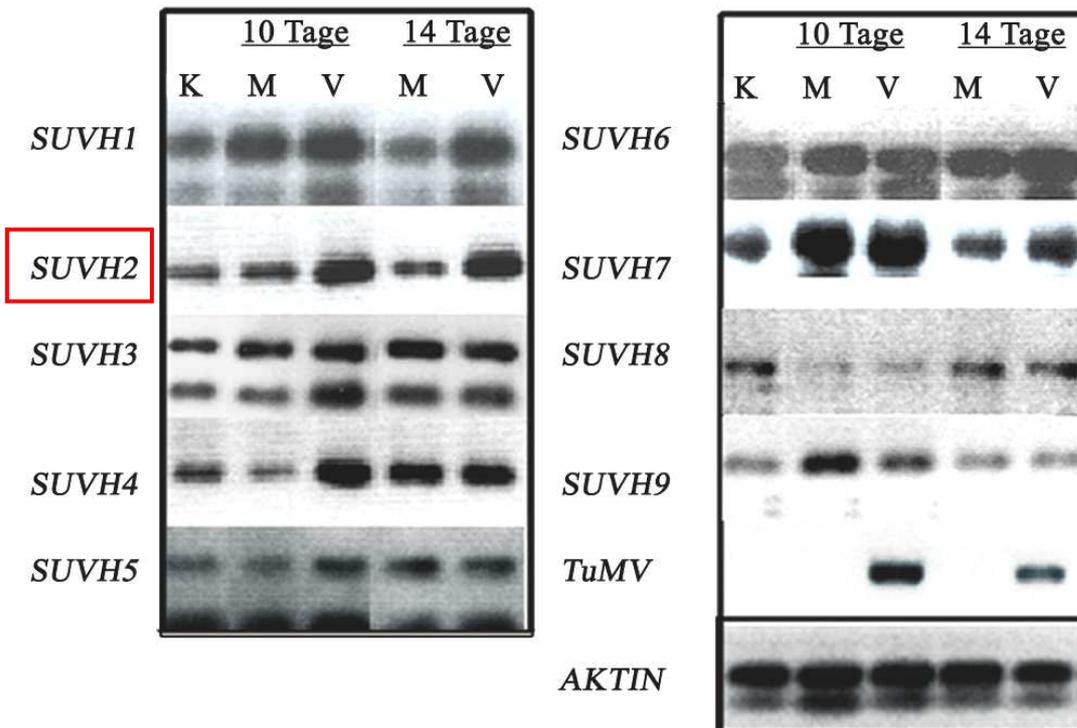


Abbildung 23: Einfluss des *TuMV* Virus auf die Expression der *SUVH*-Gene in *Arabidopsis thaliana*. (A) Der Nachweis des Virus erfolgte in den Proben, die nach 10 und 14 Tagen gesammelt wurden. Im Wildtyp wurden in der *Real Time*-PCR keine Unterschiede in der Expression für die Gene *SUVH 1* und *SUVH3-SUVH9* detektiert. Nur für *SUVH2* konnte eine erhöhte Expression nach Virusinfektion nachgewiesen werden. (B) In der semiquantitativen PCR konnte nur für *SUVH2* erhöhte Expression in den *TuMV* infizierten Proben nachgewiesen werden

Die *Real Time*-PCR (Abb. 23A) und die semiquantitativen RT-PCR (Abb. 23B) zeigten eine erhöhte Expression von *SUVH2*. Die Transkripte von *SUVH1* und *SUVH3-SUVH9* blieben unverändert.

3.6.2 Induktion von *SUVH4* bei Virus-Infektion in der *svh2* SALK-Linie

Im gleichen Umfang wurde die SALK Mutante *svh2* untersucht (Abb. 24). In dieser Mutante konnte kein *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden. Der Nachweis des Virus erfolgte in den Proben, welche nach 10 und 14 Tagen gesammelt wurden. Die *svh2* Probe nach 10 Tagen expremierte das Virus im geringeren Umfang als die Probe nach 14 Tagen. Es soll untersucht werden, welchen Einfluß das *TuMV* Virus auf die Expression der *SUVH*-Gene hat.

In der *svh2* Mutanten erfolgte der Nachweis der Gene *SUVH1-SUVH9* mittels quantitativer *Real Time* PCR (Abb. 24A) und semiquantitativer PCR (Abb. 24B). Das Transkript *SUVH2* wurde in der *svh2* SALK Mutante nicht nachgewiesen (Abb. 24).

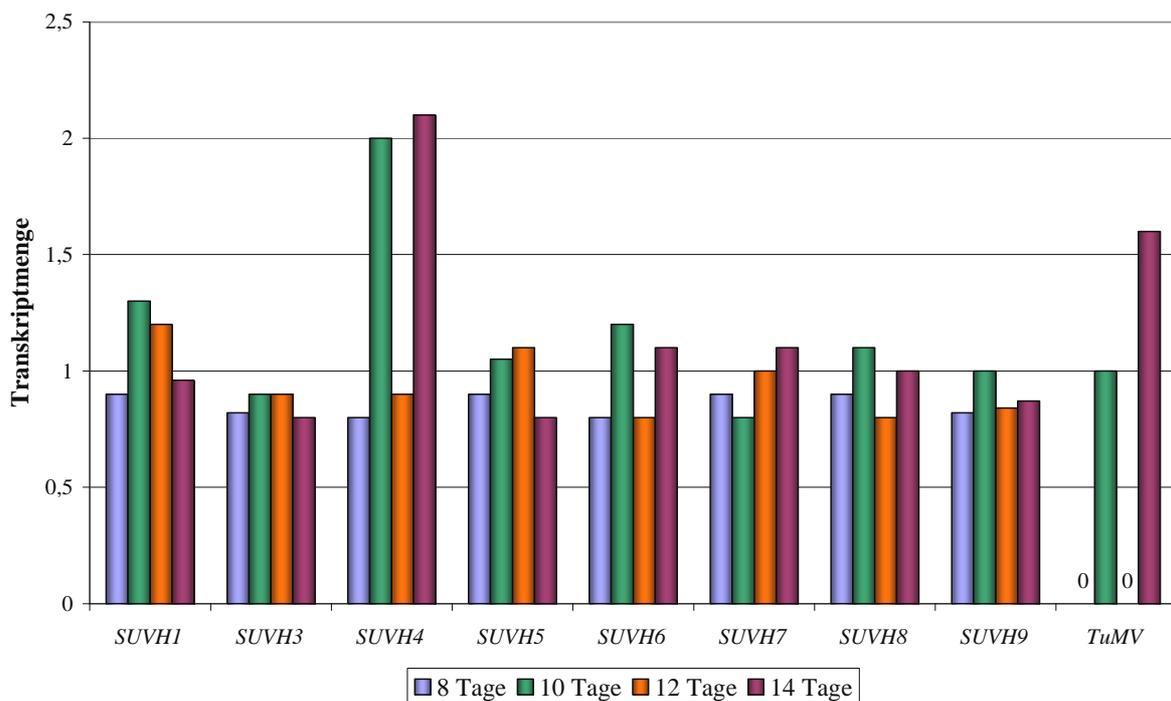
In der quantitativer *Real Time* PCR wurde der Wert der Virus infizierten Probe V durch den Wert der Kontrolle M dividiert (Abb. 24A).

Die Transkripte der Gene *SUVH1*, *SUVH5-SUVH9* zeigten in der Mutante *svh2* keine veränderte Expression während der Virusinfektion (Abb. 24A).

In der semiquantitativen PCR der infizierten Proben wurde für die Linie *svh2* eine leicht erhöhte Expression von *SUVH3* (Abb. 24B).

In der *Real Time*-PCR und in der semiquantitativen PCR der infizierten Proben der *svh2* Mutante wurde für das Gen *SUVH4 (KYP)* eine erhöhte Transkriptmenge festgestellt (Abb. 24).

A



B

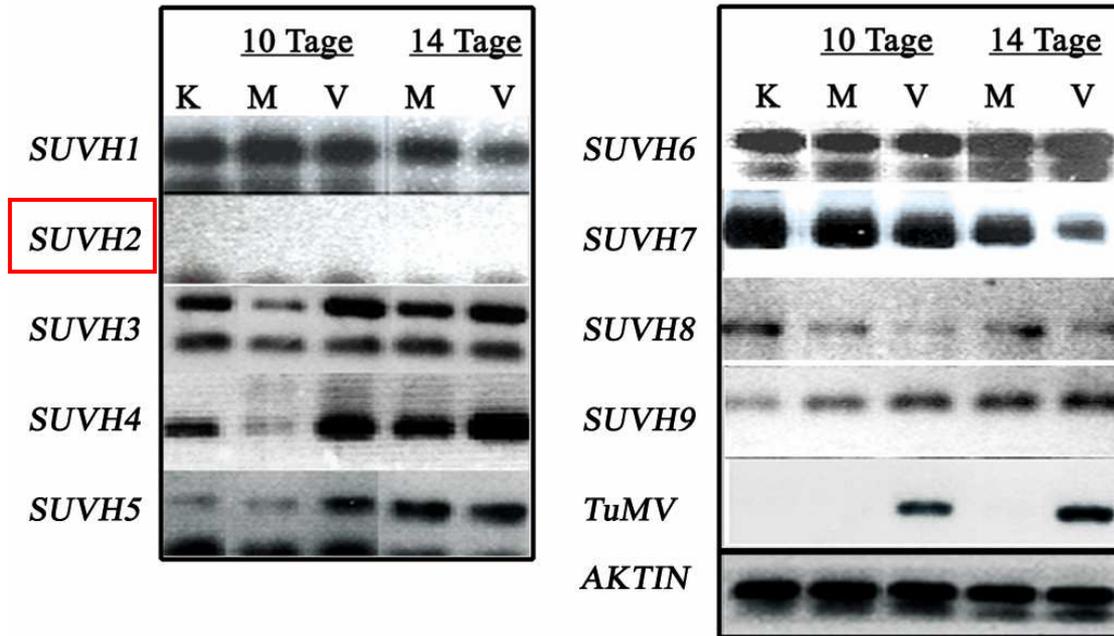


Abbildung 24: Einfluss des *TuMV*-Virus auf die Expression der *SUVH*-Gene in der *svh2* SALK-Linie. (A) Das Virus konnte mittels *Real Time*-PCR in den Proben nach 10 und 14 Tagen nachgewiesen werden. In der *svh2* Mutante wurde kein Transkript *SUVH2* expremiert. Die Expression von *SUVH1*, *SUVH5*-*SUVH9* blieb unverändert. In der *svh2* Nullmutante erfolgte eine erhöhte Expression von *SUVH4*. (B) Analyse der Expression der *SUVH*-Gene mittels semiquantitativer RT-PCR. In der *svh2* Mutante konnte kein Transkript *SUVH2* nachgewiesen werden. In der Mutante reagiert vor allem *SUVH4* mittels einer erhöhten Expression auf die Virusinfektion. Eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge wurde auch für *SUVH3* nachgewiesen.

Bei der Virusinfektion des Wildtyps wurde vor allen die Expression von *SUVH2* erhöht. In der *svh2* Nullmutante konnte eine höhere Expression für das Gen *SUVH4* festgestellt werden. *SUVH2* ist an Abwehrprozessen beteiligt, dies ist an einer deutlich erhöhten Transkriptmenge während einer Virusinfektion im Wildtyp zusehen. In der SALK Mutante *svh2* wurde das fehlende *SUVH2* Transkript durch eine erhöhte Expression von *SUVH4* kompensiert.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteinen in Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SET-Domänen Protein SUVH2 in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert und funktionell analysiert. SET-Domänen wurden in Proteinen gefunden, die beteiligt sind an der Regulation von Chromatin und der Katalyse der Lysin-Methylierung (Bottomley, 2004; Marmorstein, 2003; Xiao, 2003).

In den letzten Jahren wurden in Pflanzen eine grössere Anzahl von SET-Domänen Proteinen identifiziert als in tierischen Organismen (Baumbusch et al., 2001; Springer et al., 2003). So wurden in *Zea mays* insgesamt 22 SET-Domänen Proteine gefunden (Springer et al. 2003). In *Arabidopsis* konnten 37 Proteine identifiziert werden, wobei für 29 Gene eine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen wurde (Baumbusch et al. 2001). Die vierzehn in *Mais* gefundenen SU(VAR)3-9-homologen Proteine wurden von Springer et al. 2003 als Klasse fünf bezeichnet. Diese Gruppe wurde weiter unterteilt, in Proteine mit und ohne YDG-Domäne, ähnlich den SUVH und SUVR Proteinen in *Arabidopsis* (Baumbusch et al. 2001). Alle Proteine der Klasse fünf wiesen, wie die Proteine aus *Arabidopsis*, eine N-SET/SET/C-SET-Domänen Struktur auf. Eine Analyse der Sequenzen aus *Mais* zeigte, dass nur das YDG/SET-Domänen Gen *SDG118* eine Exon/Intron Struktur, wie KYP aufwies (Springer et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SU(VAR)3-9 homologe Gen *SUVH2* und die Gene *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH4* (*KYP*) und *OsSET1* konnten im Kern lokalisiert werden. Das Gen *SUVH2* wurde in allen untersuchten Pflanzenorganen nachgewiesen, genau wie *SUVH1*. Das Transkript *SUVH3* konnte in den Schoten nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die SUVH-Proteine zwar ähnliche Funktionen haben, aber diese durch räumliche und/oder durch zeitliche Unterschiede getrennt sind.

Es wurde in *Nicotiana tabacum* von Shen et al. 2001 das SET-Domänen Protein NtSET1 identifiziert. Das Protein NtSET1 enthält eine C-SET/SET-Domäne mit starker Homologie zu den Proteinen Clr4p und SU(VAR)3-9 (Shen et al., 2001; Yu et al., 2004).

Für die C-SET-Domäne konnte eine Interaktion mit dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (AdoMet) nachgewiesen werden, welcher den Transfer einer Methyl-Gruppe zum Lysine katalysiert (Bottomley, 2004).

Bei Überexpression von NtSET1 wurde, wie in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *#6* und *#22*, eine Inhibierung des Wachstums festgestellt (Shen et al., 2001; Shen et al., 2004; Naumann et al., 2005). Die Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *#6* und *#22* zeigten neben der Reduktion des Wachstums auch eine verkleinerte Grundrosette und kürzere Schoten als der Wildtyp. Ihre Keimlinge wiesen *curled* Kotyledonen auf. Die Reduktion des Wachstums durch NtSET1 erfolgt durch eine verminderte Zellzahl und durch eine Reduktion der Zellgröße (Shen et al., 2004).

4.2 Der Einfluss von SUVH-Proteinen auf die Ausprägung von Heterochromatin

In *Arabidopsis* erfolgte der Nachweis einer erhöhten Transkriptmenge von *SUVH2* in den Linien mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp. Die Transkription der Gene *SUVH3-SUVH5* und *SUVH7-SUVH9* blieb unverändert. Für die Gene *SUVH1* und *SUVH6* wurde eine leicht erhöhte Expression gezeigt. Über diese Gene ist noch wenig bekannt, so konnte zum Beispiel für das Protein SUVH6 eine H3K9 HMTase Aktivität nachgewiesen werden (Jackson et al., 2004; Ebbs et al., 2005).

In den Linien *35S*::mycSUVH2* mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp konnte eine erhöhte Menge an Heterochromatin und eine erhöhte DNA-Methylierung gezeigt werden (Naumann et al. 2005). Diese Linien zeigten eine erhöhte Methylierung für die heterochromatischen Histonmodifikationen Mono-H3K9, Di-H3K9, Mono-H3K27, Di-H3K27 und Mono-H4K20. Im Vergleich zum Wildtyp wurden in immunozytologischen Analysen für die euchromatischen Modifikationen Dimethyl-H3K4, Trimethyl-H3K9, Trimethyl-H3K27, Dimethyl-H3K36 und Dimethyl-H4K20 eine Reduktion gezeigt (Naumann et al. 2005).

Die Antisenselinien und die *svh2* SALK Linie, in denen kein *SUVH2*-Transkript nachgewiesen werden konnte, zeigten weder einen Phänotyp noch eine veränderte Expression der anderen *SUVH*-Gene. In diesen Pflanzen wurde eine Reduktion der heterochromatischen Histon-Methylierung Mono-H3K9, Di-H3K9, Mono-H3K27, Di-H3K27 und Mono-H4K20 gezeigt (A. Fischer, 2005).

In der Nullmutante *suvh2* konnte Herr A. Fischer eine Reduktion der heterochromatischen Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung zeigen.

Vor allem die Histonmethylierung Mono-H4K20 kann in der Mutante *suvh2* nicht nachgewiesen werden. Diese zytologischen Daten konnten durch Frau K. Irmeler in Western-Analysen bestätigt werden. Das SU(VAR)3-9 homologe Protein SUVH2 zeigt eine HMTase Funktion für die Histonmodifikationen H3K9 und H4K20. Diese multi-katalytische HMTase Aktivität wurde auch für den epigenetischen Aktivator Ash1 in *Drosophila* gezeigt, welcher zusätzlich noch die Position H3K4 methyliert (Beisel et al., 2002).

Für das *Drosophila* Protein SU(VAR)3-9 und seine homologen Proteine in Säugern konnte nur eine Methylierung an Histon H3K9 gezeigt werden. Die Methylierung von Histon H4K20 erfolgt durch das Protein SUV4-20. Das Protein SUV4-20h aus der Maus vermittelt die Histon H4K20-Trimethylierung am perizentromeren Heterochromatin (Schotta et al. 2004).

Für spezifische Loci konnte eine direkte Interaktion von SU(VAR)3-9 mit dem Protein HP1 gezeigt werden (Schotta et al. 2002, Greil et al., 2003). Das Protein HP1 ist mit Heterochromatin assoziiert und bindet direkt an dimethylierten H3K9 (Bannister et al. 2001, Lachner et al. 2001).

Das *Arabidopsis* Protein LHP1 (TFL2) ist ein homologes Protein des *Drosophila* Proteins HP1. In Tabak konnte eine Interaktion zwischen dem SU(VAR)3-9 homologen Protein NtSET1 und dem Protein LHP1 über *two-hybrid*- und *pull-down* Assay nachgewiesen werden (Yu et al., 2004). Der Nachweis der Kolo-kalisierung der beiden Proteine am dimethylierten H3K9 erfolgte über den Reporter YFP (Yu et al. 2004). Die Funktion von LHP1 ist die Repression der Genexpression von einigen Blütengen (Kotake et al. 2003). In *Arabidopsis* wurde mit dem Affymetrix GeneChip keine Änderung der Expression von *LHP1* (TFL2) in Pflanzen mit erhöhter oder verminderter *SUVH2*-Menge nachgewiesen.

In Säugetieren wurde zwischen dem Komplex SUV39H-HP1 und den CpG DNA-Methyltransferasen Dnmt3a (Bachmann et al., 2001) und Dnmt1 (Fuks et al., 2000) eine Verbindung gezeigt. Dnmt3a und Dnmt1 binden direkt an HP1 β und an die HMTase SUVH39H. Es wurde eine direkte Verbindung zwischen den verantwortlichen Enzymen für DNA-Methylierung und Histon-Methylierung gezeigt (Fuks et al., 2003).

Die HMTase SUV39h ist notwendig für die direkte Histon H3K9-Trimethylierung und die Dnmt3a/Dnmt1-abhängige DNA-Methylierung in den perizentrischen *Repeats*. Die DNA-Methylierung der zentromeren *Repeats* scheint unabhängig von SUV39h zu sein (Lehnerts et al. 2003).

In den SUVH2 transgenen Pflanzen wurden ebenfalls Untersuchungen mit DNA modifizierenden Proteinen durchgeführt. Mittels semiquantitativer RT-PCR erfolgte in den Überexpressionslinien der Nachweis, dass *MET1* und *DDMI* erhöht expremiert werden. In den SUVH2 Antisenselinien wurden *MET1* und *DDMI* dagegen reduziert expremiert. Eine Veränderung der Trankriptmenge von *MET1* und *DDMI* wurde auch in den Affymetrix-cDNA Expressionschip festgestellt. Beide Proteine sind für das SUVH2-induzierte *Silencing* notwendig (Naumann et al., 2005). In der Kreuzung *ddm1-2* x *35S*::mycSUVH2#6* erfolgte eine Suppression des „mini-Pflanzen“-Phänotyps. Diese Suppression des Phänotyps korrelierte mit der Abnahme der Histon-Methylierung für die Positionen Di-H3K9 und Mono-H4K20. In den Nachkommen *ddm1-2* x *35S*::mycSUVH2#6* erfolgte auch eine Reduktion der DNA-Methylierung.

Für die untersuchten Linien *35S*::mycSUVH2#6*, *35S*::SUVH2as#11* und *suvh2* wurde keine Veränderung der *CMT3* Transkriptmenge festgestellt. Das SUVH2-induzierte *Silencing* ist unabhängig von der CpNpG DNA-Methyltransferase CMT3 (Naumann et al., 2005).

4.3 SUVH2-abhängige Änderungen der Expression von SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Mit Hilfe des cDNA Expressionschips der Firma Affymetrix wurde in den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::SUVH2as#21* und *suvh2* eine genomweite Änderung der Expression gezeigt (Anhang 5.4, Anhang 5.6.1 bis 5.6.3). *SUVH2* wurde in den Pflanzen mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp 17 bis 21 mal stärker expremiert als im Wildtyp. In einigen homozygoten Antisenselinien und der *suvh2* SALK Linie konnte kein *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden.

Eine Expressionsanalyse der SET-Domänen Proteine ergab eine Veränderung der Transkriptmenge für *ASHH1* und *EZAI* (*SWN*). In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurde eine reduzierte Trankription von *ASHH1* gefunden.

Der epigenetische Aktivator ASH1 ist eine HMTase, welche nicht nur die Histonmethylierung H3K4, sondern für spezifische Loci auch die Histonmethylierung für H3K9 und H4K20 katalysiert (Beisel et al. 2002, Byrd et al. 2003).

Byrd et al. (2003) isolierte eine Mutante *ash1*, in welcher keine Histon H3K4-Methylierung nachgewiesen werden konnte. Der Verlust der H3K4-Methylierung deutet darauf hin, dass ASH1 für diese Histonmodifikation notwendig ist. ASH1 aktiviert die Transkription von *ULTRABITHORAX* in *Drosophila*.

Das Protein ASH1 ist ein Mitglied der TRX-Gruppe und ist direkt an die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Aktivität von homeotischen Genen beteiligt (Beisel et al., 2002). Die TRITHORAX homologen Proteine in Arabidopsis ATX und ATXR, welche für transkriptionell aktive Bereiche stehen (Alvarez-Venegas et al., 2003; Alvarez-Venegas et al., 2005), wiesen keine Expressionsänderung in den transgenen Linien auf.

Die Expression der Polycomb-Gruppen Proteine CLF und MEA blieben in den Linien *35S*::mycSUVH#5*, *35S*::SUVH2as#21* und *svh2* unverändert. Die Expression von *EZA1* (*SWN*) wurde in der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* reduziert, während die Expression in der Antisenselinie #21 und in der SALK Linie *svh2* erhöht wurde.

Für das *Drosophila* Protein E(Z) und seine homologen Proteine wurde vor allem eine HMTase Funktion für die Histon-Methylierung H3K27 mit geringerer Affinität für Histon H3K9 festgestellt (Cao et al. 2004, Czermin et al. 2002, Kuzmichev et al. 2002, Muller et al. 2002).

Die E(Z) homologen Proteine in Arabidopsis sind CLF, MEA und EZA1 (Baumbusch et al., 2001).

Die Proteine CLF, MEA und EZA1 aus *Arabidopsis* bilden unterschiedliche Komplexe, wobei sie alle mit dem POLYCOMB Protein FIE (*FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM*) interagieren.

Der Komplex FIS2 (*FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM*)/MEA/FIE/MSI1 (*MULTICOPY SUPPRESSOR of IRA1*) ist verantwortlich für die korrekte Initiation und das Fortschreiten der Samenentwicklung (Köhler et al., 2003; Chanvivattana et al., 2004). Neben dem Einfluss auf die Samenentwicklung wurde für den Komplex MEA/FIE eine direkte Bindung am PHE1-Promotor (*PHERES1*) nachgewiesen. Das Protein PHE1 kodiert ein MADS-Box Transkriptionsfaktor. Die direkte Bindung von MEA und FIE am PHE1-Promotor wurde in einer Chromatin Immuno Präzipitation (ChIP) gezeigt (Autran et al., 2005).

Der Komplex FIS2/MEA/FIE/MSI1 ist homolog zu den *Drosophila* PRC2-Proteinen (*Polycomb Repressive Complex 2*) E(Z), Suppressor of zeste 12 [Su(z)12], Extra sex combs (Esc) und P55 (Grossniklaus et al., 1998; Kiyosue et al., 1999; Kohler et al., 2003; Luo et al., 1999; Ohad et al., 1999).

Die Proteine CLF, EMBRYONIC FLOWERING 2 (EMF2, Yoshida et al., 2001) und FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE, Kinoshita et al., 2001) gehören zu dem POLYCOMB Gruppen Proteinen und haben einen Effekt auf die Blüteninduktion in *Arabidopsis*. Für den Komplex FIE/CLF/EMF2 (EMBRYONIC FLOWER2) stellt *AGAMOUS* das Zielgen dar (Hsieh et al. 2003).

Das Protein CLF interagiert auch mit VERNALIZATION2 (VRN2). Das Protein VRN2 wird benötigt für Kälte induzierte Repression von *FLC* (FLOWERING LOCUS C). Die Proteine VRN2, FIS2 und EMF2 kodieren Proteine mit Homologie zum *Drosophila* Su(z)12 (Gendall et al., 2001).

Die Reduktion der Expression von EZA1 (SWN) in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* führt zu keinen Veränderungen, da es wahrscheinlich durch CLF kompensiert wird.

Das E(Z) homologe Protein EZA1 (SWN) interagiert wie CLF mit dem Proteinen FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM) und EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2). CLF und SWN haben nicht nur identische Interaktionspartner, beide zeigen auch ein ähnliches Expressionsmuster. Die *clf* Mutante weist dabei einen Phänotyp auf, während *swn* Mutanten keinen Phänotyp besitzen. In der Doppelmutante *clf/swn* wird der Phänotyp verstärkt (Chanvivattana et al., 2004). Die reduzierte Expression von SWN in *SUVH2* Überexpressionspflanzen führt zu keinen Veränderungen der Blüteninduktion und Blütenentwicklung.

4.4 Das Silencing von Retrotransposons in *Arabidopsis*

Neben den Veränderungen der Expression von SET-Domänen Genen, wurde durch Überexpression von *SUVH2* eine große Anzahl von reduziert exprimierten Genen aus verschiedenen Bereichen gefunden. Eine dieser Gruppen stellen die transponiblen Elemente dar. In den Überexpressionslinien *35S*::mycSUVH2#5* und *#6* wurde eine reduzierte Expression von mehreren *ATHILA* Transkripten gefunden.

Das Retrotransposon *Athila* ist ein degeneriertes Retroelement (Wright et al., 2001). Es gehört zum Typ der Ty3-Gypsy Retrotransposons und ist durch LTR-Sequenzen (*long terminal repeat*) begrenzt.

In *Athila* sind die viralen Proteine *env*, *pol* und *gag* enthalten (Marin et al 2000, Vicient et al. 2001). Das Protein *env* kodiert ein Transmembranprotein, das mit der Zellmembran assoziiert ist. Das virale *env* Protein interagiert mit zellulären Rezeptoren und vermittelt die Infektion. *Pol* kodiert für eine *Reverse Transkriptase*. Das Protein *gag* kodiert eine konservierte Domäne, die charakteristisch ist für das *nucleocapsid* Protein. *Gag* und *pol* werden in einem ORF transkribiert [*gag* Finger, Protease, Rev. Transkriptase, RnaseH, Integrase (Marco et al., 2005)]. Danach folgen nichtkodierende Bereiche und das Protein *env*. Das Retroelement *Athila* ist mit bis zu 200 Kopien im *Arabidopsis* Genom integriert (Burch et al., 2004).

Der Unterschied zwischen den verschiedenen *ATHILA* Kopien liegt im Grad ihrer Degenerierung, welcher die Möglichkeit bietet, sie in Gruppen zu gliedern. So enthalten die *Athila1*-, *Athila2*- und *Athila3*- Familien eine Deletion der *Reverse Transkriptase*. Die Familie *Athila4* gehört mit ca. 22 Mitgliedern zu der umfangreichsten Familie (Wright et al., 2001). In anderen Dikotyledonen wurden ähnliche Sequenzen gefunden, so wurden in der Erbse das Retrotransposon *Cyclops* (Vicient et al., 2001) und in Soja das Retrotransposon *Diaspora* (Yano et al. 2005; Marco et al., 2005) identifiziert.

In der Überexpressionslinie 35S*S::mycSUVH2#5 betrifft die reduzierte Expression unterschiedliche *ATHILA* Gruppen, dazu gehören *ATHILA1*, *ATHILA5* und *ATHILA6*. Für das Retrotransposon *ATHILA* wurde in der Linie 35S*S::mycSUVH2#5 mittels Bisulfid Sequenzierung eine erhöhte Methylierung der DNA in allen Motiven nachgewiesen, vor allen aber für die Methylierung im asymmetrischen Motiv (Naumann et al. 2005). *SUVH2* Überexpression hat nicht nur Einfluss auf die Expression von *ATHILA*, sondern es konnte auch eine reduzierte Expression für die Transposons *DEL1*, *PttA*, *TA1-1* und *EN/SPM* nachgewiesen werden. Die Expression des DNA Transposons *AC* blieb unverändert. Dies deutet darauf hin, dass *SUVH2* beim *Silencing* von Transposons beteiligt ist. Über das *Silencing* von Transposons wurde eine Reihe von Daten gesammelt.

Die DNA-Methyltransferase (*met1*), die *Chromatin-Remodeling*-ATPase (*ddm1*), die HDA6 Mutante (*sill*), die Histon H3K9-Methyltransferase KRYPTONITE und die CpNpG Methyltransferase CHROMOMETHYLASE3 spielen eine Rolle bei der Methylierung von Transposons, der Transkription und der Histonmethylierung von H3K9 (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002; Tariq et al., 2003).

Für das Retrotransposon TA3 (AtCOPIA44) konnte in der Mutante *cmt3* eine Reaktivierung gezeigt werden (Johnson et al., 2002).

Die Retrotransposons der Gypsy-Klasse zeigen keine Änderung in ihrer Aktivität und die DNA Transposon zeigen nur schwache Effekte. Zwischen der HMTase SUVH2 und der DNA-Methyltransferase CMT3 wurde keine Interaktion nachgewiesen, dagegen konnte eine Beziehung zwischen CMT3 und KYP gezeigt werden (Jackson et al., 2000; Lindroth et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass in *kyp* Mutanten das Retrotransposon TA3 ebenfalls reaktiviert wird, da der *Silencing*-Komplex inaktiviert vorliegt.

Die Retroelemente AtLANTYIS2 und AtENSPM2 (degenerierte AtCOPIA und VANDAL Elemente Ta2, At4g03870) wurden in der Nullmutante *met1*, welche eine drastische Reduktion an Histon H3meK9-Methylierung zeigen, reaktiviert. Die CpG-Methylierung der DNA wird für die HMTase-Aktivität an diesen *Loci* benötigt (Tariq et al. 2003).

Kürzlich wurde in Arabidopsis gezeigt das hypermethylierte DNA im symmetrischen Motiv CpG die Histon H3K27-Trimethylierung, welche in Euchromatin gefunden wurde, verhindert (Mathieu et al., 2005). Die heterochromatischen Modifikationen Monomethyl-H3K27 und Dimethyl-H3K27 dagegen sind nach Mathieu et al. (2005) unabhängig von der DNA-Methylierung.

Es wird spekuliert, dass die Proteine MET1, DDM1, und HDA6 zusammen einen Komplex bilden (Lippman et al. 2003). Zwischen SUVH2 und den Proteinen DDM1 und MET1 konnte eine Beeinflussung nachgewiesen werden. Die Interaktion der Linie 35S*::*mycSUVH2#6* mit dem Allel *ddm1-2* (Vongs et al. 1993) führte zu einer Repression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps. Des weiteren konnte Herr I. Hofmann (persönliche Mitteilung) eine Interaktion zwischen SUVH2 und HDA6 zeigen. So wurde durch ein Allel von HDA6 eine Suppression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps gezeigt. Des weiteren wurde durch das HDA6 Allel *sill* eine erhöhte Histon-Methylierung verhindert, da die Mutante nicht in der Lage ist, die Lysine des Histons H3 zu deazetylieren (Lippmann et al., 2003).

Für den *Silencing*-Komplex MET1/ DDM1/SIL1 könnte die HMTase SUVH2 der fehlende Interaktionspartner für spezifische *Loci* darstellen. Zu diesen *Loci* gehören z. Bsp. die Transposons *ATHILA*, *DEL1*, *PttA* und *TAI-1*. Für das Transposon AC (Jarvis et al., 1997) sollte eine andere HMTase als SUVH2 eine Rolle spielen.

4.5. Dosisabhängiger Effekt von SUVH2 auf *Transgene Silencing*

Neben der genomweiten Expressionsänderung einer Vielzahl unterschiedlicher Gene wurde auch der Einfluss von SUVH2 auf die Aktivität anderer T-DNA's untersucht.

Bei Überexpression von SUVH2 erfolgte eine stärkere Inaktivierung der LUZIFERASE, während in der Antisenselinie eine erhöhte Aktivierung zu beobachten war. Dieses verstärkte *Silencing* wurde in den Generationen BC1, F2 und F3 stabil weiter vererbt. Die Reduktion des endogenen *SUVH2*-Transkriptes führte zu einer höheren Aktivität der LUZIFERASE, dies blieb in der BC1-Generation und in den Generationen F2 und F3 stabil.

SUVH2 hat einen Dosis abhängigen Effekt auf das *Transcriptional Gene Silencing*. Der SUVH2 abhängige Effekt wurde stabil in die nächste Generation vererbt. Bei diesen Prozeß handelt es sich um *Imprinting*. Der Mechanismus, der dem zugrunde liegt, ist eine spezifische epigenetische Modifikation, die zu einer Stilllegung des Gens (*LUZIFERASE*) führt. Durch Herr S. Phalke konnte in der Überexpressionslinie eine erhöhte DNA-Methylierung in symmetrischen und asymmetrischen Motiven der *LUC*-Sequenz nachweisen.

In der Antisenselinie wurde eine reduzierte DNA-Methylierung gezeigt. Die Stärke der Methylierung des Gens *LUZIFERASE* steht im direkten Zusammenhang mit dessen Aktivität (Naumann et al., 2005). Der SUVH2 Dosis abhängige Effekt auf die Aktivität der Luciferase wurde stabil in die nächste Generation, trotz Abwesenheit der T-DNA, weitervererbt.

Bei diesem Prozess handelt es sich um *Imprinting*, wobei die veränderte Methylierung der *LUZIFERASE* auf die nächste Generation übertragen wurde.

Imprinting wurde in verschiedenen Organismen gefunden, in der Maus sind etwa 60 solcher Gene gekannt. *Imprinting* Gene werden häufig in chromosomalen Clustern gefunden. Sie zeigen eine unterschiedliche DNA-Methylierung in ihren Konrollregionen (Reik et al., 2001). Exprimierte Allele von *imprinting* Genen sind hyperazetyliert in H3 und H4, während stillgelegte Gene hypoazetyliert vorliegen (Li et al., 2001; Gehring et al., 2004). Polycomb-Gruppen Komplexe sind beteiligt am *Imprinting*.

Die Mutation des Polycomb Gruppengens *Embryonic ectoderm development* (Eed; das Maus Homolog zu Arabidopsis FIE) führt zu einer Reaktivierung des inaktiven X-Chromosoms (Wang et al., 2001) und den Verlust von *imprinting* des autosomal, paternal stillgelegten Gens (Mager et al., 2003).

In Arabidopsis wurde für das Polycomb Gruppen Protein MEDEA *Imprinting* nachgewiesen, wobei das Arabidopsis Protein DEMETER (DME, DNA Glykosylase), dass maternale Allel des stillgelegten *MEDEA* (*MEA*) Gens im Endosperm aktiviert (Choi et al., 2004, Grossniklaus et al., 1998; Guitton et al. 2005). Des weiteren wurde erkannt, dass die Methyltransferase MET1 die Expression des maternalen *MEA* Allels suppremiert.

Dies erfolgt entweder durch direkte Methylierung des *MEA*-Promotors oder MET1 methyliert und suppremiert ein unbekanntes Gen, welches die maternale *MEA* Expression im femalen Gamtophyten aktiviert (Xiao et al., 2003, Autran et al., 2005). Das Imprinting von *MEA* wird durch die Antagonisten MET1 (Methyltransferase) und DME (DNA-Glycosylase) kontrolliert. Des weiteren wurde gezeigt, dass die Aufrechterhaltung der Repression am *MEA* Locus die zygotische Aktivität von DDM1 erfordert (Vielle-Calzada et al., 1999).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Imprinting nachgewiesen (Adams et al., 2000; Berger et al., 2003; Fransz et al., 2003; Gehring et al., 2004; Kankel et al., 2003).

4.6 Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteine

In Arabidopsis wurden mittels EMS-Mutagenese funktionelle Analysen der Domänen durchgeführt. Eine Reihe von Mutanten wurden isoliert, deren Mutation im transgenen SUVH2 liegen. Die Mutationen betrafen die gesamte Sequenz. Es wurden Mutationen in der YDG-Domäne, im N-Terminus vor der YDG-Domäne, N-SET-Domäne und in der SET-Domäne isoliert. Diese identifizierten Allele von SUVH2 zeigten eine Suppression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps. Sie zeigten auch eine Reaktivierung von Sequenzen, welche in der Ausgangslinie 35S*::mycSUVH2#5 stillgelegt wurde. Eine transkriptionelle Reaktivierung konnte für die Transposons Ta1-1 und Athila gezeigt werden.

Herr A. Fischer untersuchte die DNA-Methylierung (5-MeC) und die Histon-Methylierung (dime-H3K9; monome-H4K20) in diesen Allelen.

Diese Untersuchung erfolgte mittels immunozytologischer Analysen.

Die Allele, deren Mutationen im N-Terminus vor der YDG-Domäne, in der YDG-Domäne und vor der N-SET-Domäne liegen, zeigten im Vergleich zur Ausgangslinie *35S*::mycSUVH2#5* eine reduzierte DNA-Methylierung und eine Reduktion der Histon H3K9- und H4K20-Methylierung.

Für Mutationen innerhalb der SET-Domäne konnte keine reduzierte DNA-Methylierung, sondern nur eine Reduktion der Histon H3K9- und H4K20-Methylierung nachgewiesen werden (Naumann et al. 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass der N-Terminus von SUVH2 für die Erkennung der Zielsequenzen wichtig ist, während die SET-Domäne für die HMTase Funktion von SUVH2 verantwortlich ist.

Die SUVH2 vermittelte DNA-Methylierung scheint der Histon-Methylierung voranzugehen (Naumann et al. 2005).

Für das aus Tabak identifizierte NtSET1-Protein konnte ebenfalls eine HMTase-Aktivität für das Histon H3 an den Positionen K9 und K27 nachgewiesen werden (Yu et al. 2004).

Für den N-Terminus (YDG/SRA-Domäne) von NtSET1 wurde eine Bindung in der Interphase an Chromatin nachgewiesen. Die C-SET- und die SET-Domäne sind wichtig für die Bindung des Proteins an spezifischen Kernregionen und für die Bindung an kondensierten mitotischen Chromosomen (Yu et al. 2004).

Seit einiger Zeit wird die Frage untersucht, „*What's first?*“. Es soll geklärt werden, ob die DNA-Methylierung die Histon-Methylierung beeinflusst oder umgekehrt. Die DNA-Methylierung ist beteiligt an eigenetischen Prozessen, wie X-Chromosom Inaktivierung, *Imprinting* und *Silencing* von Transposons.

Es wurden Beispiele gefunden, in denen die DNA-Methylierung durch die Histon-Methylierung beeinflusst wird (Tamaru et al., 2001; Tamaru et al., 2003; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002; Lindroth et al., 2004). In *Neurospora crassa* konnte an einer Mutante der Histonmethyltransferase *dim-5* (*defective in methylation*) gezeigt werden, dass die DNA Methylierung abhängig ist von der Histonmethylierung (Tamaru et al., 2001; Tamaru et al., 2003). In *Arabidopsis* erfolgte der Nachweis, dass die CpNpG Methylierung von CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) kontrolliert wird von der Histon H3K9-Methylierung durch KRYPTONITE (KYP=SUVH4; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002; Lindroth et al.; 2004).

Es wurden auch Beispiele gefunden, die zeigten, dass die DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Histonmethylierung hat (Johnson et al., 2002; Soppe et al., 2002; Tariq et al. 2003).

In Arabidopsis *met1* Mutanten wurde eine reduzierte Methylierung für das Motiv CpG gefunden. Diese reduzierte DNA-Methylierung beeinflusst die Histon-Methylierung H3K9 (Tariq et al., 2003). Eine Reduktion der Methylierung von H3K9 wurde durch ChIP (*Chromatin Immuno Precipitation*)-Analysen in *ddm1* und in *met1* Mutanten festgestellt (Johnson et al., 2002).

Des Weiteren fanden Soppe et al. (2002) in den Mutanten *met1* und *ddm1* ein reduziertes H3K9 Methylierungssignal an den Chromozentren.

4.7 Einfluss von SUVH2 auf die Expression der Resistenzgene

Neben dem Einfluss von SUVH2 auf die Expression von Transposons wurde die Änderung der Expression von Resistenzgenen untersucht.

Die Pflanze versucht mit Hilfe ihrer Resistenzgene der Infektion entgegen zu wirken (Baker et al., 1997; Diaz-Pendon et al., 2004). Durch Überexpression von SUVH2 kommt es zu einer Expressionsänderung, wobei Resistenzgene sowohl *down*- als auch *up*-reguliert wurden (Cooper et al. 2001, Whitman et al 2003).

In der Linie *35S*::mycSUVH2#5* wurden insgesamt 33 *Down*-regulierte Gene identifiziert, welche bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (Anhang 5.6.3). Dagegen wurden nur 9 Gene gefunden, welche in der Linie *35S*::mycSUVH2#5* stärker exprimiert wurden als im Wildtyp (Anhang 5.6.3).

Es wurde eine reduzierte Expression für RPS4 identifiziert. Das Arabidopsis Protein RPS4 gehört zu der Klasse der *Toll/interleukin-1receptor/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat (TIR-NB-LRR)* Resistenz Gene (R).

Eine transiente Expression von *35S::RPS4* induziert in Tabakblättern eine *AvrRps4*-abhängige *hypersensitive response* (HR). In Deletion-Analysen der RPS4-Domänen wurde gezeigt, dass die TIR-Domäne für die Ausprägung der HR-Phänotypen benötigt wird (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der durch *RPS4* Expression resultierende Zelltod abhängig ist von den 3 Signalkomponenten EDS1, SGT1 und HSP90.

Zu den supprimierten Genen gehörten neben *RPS4* auch *EDS1*, *RPP1-WsC*, *Hcr9-9A*, *RPP5*, *Cf-2.1* und *Hcr2- 5b*. Das Protein EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*), welches bei Pathogen Abwehrprozessen eine Rolle spielt, hat eine Funktion als Triacylglycerol-Acyl-Hydrolase.

Es ist beteiligt an Salizylsäure vermittelten Abwehrprozessen der Pathogene in *Arabidopsis*. EDS1 wird gemeinsam mit den Proteinen SGT1 und HSP90 benötigt bei der AvrRps4-abhängigen HR, welche durch die Expression von RPS4 induziert wird ((Mindrinos et al., 1994; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Das Protein EDS1 wird benötigt für Expression der TIR-NBS-LRR Proteine, welche für die Induktion der Resistenz notwendig sind.

Das *Arabidopsis* Protein RPP1-WsC gehört ebenfalls zu der TIR-NBS-LRR Resistenzklasse und wird in einem Resistenzcluster auf Chromosome 3 kodiert.

In diesem Bereich liegen folgende Resistenz Gene *RPP1-WsA*, *RPP1-WsB* und *RPP1-WsC* (Botella et al., 1998; Shirano et al. 2002).

Das suppressierte *Arabidopsis* Protein RPP5 gehört ebenfalls zur TIR-NBS-LRR Resistenzklasse. Das Protein RPP5 erkennt nicht nur *Peronospora parasitica* Noco2, sondern auch *P. parasitica* Emoy2 und Emwa1 (van der Biezen et al., 2002).

Das suppressierte Gen *Hcr9-9A* erkennt verschiedene Elicitoren und schützt reife Pflanzen vor Infektionen. Neben HCR9-9A gehören auch die Proteine HCR9-9B, HCR9-9D, und HCR9-9E zu dieser Gruppe. Die HCR9 Gruppe ist auch unter der Bezeichnung Cf-9 zu finden (Panter et al., 2002). Das *Arabidopsis* Protein Cf-9 erkennt das pathogen kodierte Peptide Avr9 (Jones et al., 1998; Tör et al., 2004). Zu dieser Gruppe gehören neben Cf-9 auch Cf-2, Cf-4 und Cf-5. Sie sind verantwortlich für die Resistenz gegen das *Cladosporium fulvum* (Avr2, Avr4, Avr5; Thomas et al., 1998; Dixon et al., 2000).

Neben *down*-regulierten Genen wurden auch einige Gene stärker exprimiert als im Wildtyp. Zu diesen Genen gehören die Proteine *Pathogenesis-related* (PR)-5 und (PR)-1. Die Pflanzen akkumulieren eine große Anzahl von *Pathogenesis-related* (PR) Proteinen, wenn diese mit Krankheitserregern wie Bakterien, Pilze und Viren konfrontiert werden (Hu et al., 1997). Die Akkumulationen dieser Proteine korreliert mit der Entwicklung der systemischen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR; Riechmann et al., 1992; Wang et al., 2005). Die *systemic acquired resistance* (SAR) wurde etabliert als Ergebnis der NPR1 (*Nonexpressor of pathogenesis related (PR) genes 1*) -regulierten Expression von *pathogenesis-related* (PR) Genen.

Eine erhöhte Expression dieser Gene ist essentiell für die SAR-Reaktion der Pflanze (Wang et al., 2005).

Die evolutionär konservierten PR-Proteine können in 5 Gruppen untergliedert werden.

Die PR1-Familie enthält meist saure Proteine, während die Familien PR2 und PR3 oft die Funktionen von Glucanasen und Chitinasen aufweisen und somit eine antifungale Aktivität besitzen (Hu et al., 1997). Die Mitglieder der Familie PR4 sind saure Proteine, sie haben eine antifungale Aktivität und handeln gemeinsam mit den PR2 und PR3 Proteinen. Die *Pathogenesis-related* (PR)-5 Proteine sind eine Familie von Proteinen, welche durch eine Vielzahl von Phytopathogenen in vielen Pflanzen induziert werden. Sie weisen eine Sequenzähnlichkeit mit Thaumatin auf (Hu et al., 1997).

Mitglieder der PR5-Gruppe wurden in *Arabidopsis* nach einer Infektion mit dem Virus *TMV* (*tobacco mosaic virus*), *Pseudomonas syringae* oder nach Behandlung mit 2,6-Dichloroisonikotinsäure (INA) oder Salizylsäure (SA) identifiziert (Hu et al., 1997; Peng et al., 2005).

In der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* wurden die Gene *PR1* und *PR5* stärker expremiert als im Wildtyp. Whitman et al. (2003) untersuchte die Änderung der Expression in *Arabidopsis* nach einer Virusinfektion mit den Viren *TVCV*, *ORMV*, *PVX*, *CMV* und *TuMV*. Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR (QRT-PCR) konnte ein Induktion von Genen der Pathogenabwehr nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 114 unikale Gene identifiziert, die in allen Virus infizierten Pflanzen hoch reguliert waren. 35 von diesen Genen sind mit der Stressantwort assoziiert oder regulieren diese. Des weiteren wurde die Expression von HSP Proteinen induziert.

4.8 Interaktion zwischen SUVH2 und dem Virus *TuMV*

Nach der Untersuchung der Expressionsänderung einiger Resistenzgene in der Überexpressionslinie wurden die Veränderungen in der Expression von *SUVH*-Genen, während einer Virusinfektion mit *TuMV* untersucht.

Das Virus *TuMV* gehört wie die Mehrheit der Pflanzen infizierenden Viren zu den RNA-Viren. Diese replizieren sich zunächst und es folgt eine Vermehrung von Zelle zu Zelle und schließlich werden benachbarte Pflanzen infiziert. Für diesen Prozeß werden vom Virus Wirtsfaktoren induziert, welche für die Replikation, die Vermehrung, die Bewegung und die Suppression der Wirtsabwehr notwendig sind. Dieser Mechanismus dient der Vermehrung des Virus.

Der RNA Potyvirus *TuMV* (*Turnip Mosaic Virus*) ist in der Lage, Kreuzblütler zu infizieren.

Aus einer Infektion der Pflanze mit *TuMV* resultieren verschiedene Symptome, wie die Ausprägung des Blattmosaics und die Ausbildung von Nekrosen (Kaneko et al., 2004).

Für den Ökotyp Col-0 (Columbia) wurde eine Entwicklung des Mosaic Symptoms nach TuMV Infektion identifiziert. Eine nekrotische Entwicklung erfolgt bei einer *TuMV* Infektion des Ökotyps Ler (*Landsberg erecta*). Die nekrotischen Symptome werden durch das dominante Gen TuNI (*TuMV necrosis inducer*; Kaneko et al., 2004) induziert.

Die P3 kodierende Region ist verantwortlich für die systemische Infektion und für ihre Symptome (Swaney et al., 1995; Moreno et al., 1998; Sanchez et al., 1998; Johansen et al., 2001). Des weiteren interagiert P3 mit dem viralen P1 Protein und mit dem viralen Proteinen des putativen Replikationskomplexes, der RNA-Helikase und dem VPg-Protein (viral protein genom linked; Guo et al., 1997; Dunoyer et al., 2004). P1 und P3 sind in der Phase der Virus Replikation und während der Ansammlungsphase, wenn keine strukturellen Proteine gebildet werden, aktiv. Sie sind an der Virus Vermehrung beteiligt. In Tabak wurden P1 und P3 Transgen exprimiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Keimlinge der P3 transgenen Linien in ihrer Entwicklung gehemmt waren. Dies ist ein Hinweis für den schädlichen Effekt von P3 in der Pflanze (Moreno et al., 1998). Infizierte Pflanzen sind steril oder zeigen eine reduzierte Fertilität (Lellis et al 2002). Der *Turnip mosaic virus* bindet das virale Protein (*virus genome-linked protein, VPg*) an den pflanzlichen Initiationsfaktor *eIFiso4E* und inhibiert die Expression der Wirtsgene. Die Expression der Wirtsgene, Aktin und Tubulin ist während der Virus Replikationsphase nicht verändert. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Virus für seine Translokation in der Zelle und zwischen den Zellen das Zytoskelet nutzt (Maule et al 2002).

Nach einer *TuMV*-Infektion des Wildtyps und der *suvh2* Nullmutante wurde zunächst das virale Transkript P3 nachgewiesen. Danach erfolgte der Nachweis der Transkripte *SUVH1-SUVH9*, wobei besonders auf Expressionsunterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Material geachtet wurde. In den *TuMV*-infizierten Wildtypproben wurde eine eindeutig erhöhte Transkriptmenge für *SUVH2* gezeigt. Die Transkripte der Kontrollgene *18SrDNA*, *Aktin* und die Transkripte von *SUVH1* und *SUVH3-SUVH9* zeigten keine Expressionsänderung aufgrund der Virusinfektion.

In der Mutante *suvh2* konnte in keiner Probe das Transkript von *SUVH2* nachgewiesen werden. Das *SUVH3* Transkript lag in den virus-infizierten Proben leicht erhöht vor. Das *SUVH4* zeigte eine stärkere Erhöhung der Expression als *SUVH3*. *SUVH4* scheint in der *suvh2* Nullmutante die Funktion des Gens *SUVH2* zu kompensieren.

SUVH2 ist an Abwehrprozessen beteiligt, dies ist an einer deutlichen Induktion von *SUVH2* bei einer Virusinfektion im Wildtyp zu sehen. In der Mutante *suvh2* wurde das fehlende *SUVH2*-Transkript durch die erhöhte Expression von *SUVH4* kompensiert.

4.9. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von SET-Domänen Genen in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia. Es wurden mittels einer Datenbanksichtung 10 homologe SU(VAR)3-9 Proteine identifiziert.

AtSUVH2, ein Mitglied dieser Gruppe wurde näher untersucht. Es ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, welches auf Chromosom 2 in der Nähe des Markers *ve015* lokalisiert wurde.

Für die Analyse von *SUVH2* wurden transgene Linien etabliert. In den Linien *35S*::mycSUVH2#5*, #6 und #22 konnte eine erhöhte Menge an *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden. Diese Überexpression von *SUVH2* führt zur Ausprägung von „*curled*“-Kotyledonen und „*curled*“-Blättern. Die Überexpressionslinien #5, #6 und #22 sind durch ein vermindertes Wachstum gekennzeichnet, dieser Phänotyp wurde als "mini-Pflanzen" bezeichnet. Die *suvh2* Mutante und die *SUVH2* Antisenselinien weisen keinen Phänotyp auf. In diesen transgenen Linien wurde der Einfluss von *SUVH2* auf die genomweite Expression untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf den Effekt der Überexpression von *SUVH2* gelegt. In der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* kommt es zu einer genomweiten reduzierten Expression verschiedener Transposons (*ATHILA*, *En/Spm*, *PttA*) und Genen der Pathogenabwehr (*RPP1*, *RPP5*, *EDS1*, *Hcr9-9*). Für einige Gene konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden. In diese Gruppe gehören die *Pathogenesis related* Proteine *PR1* und *PR5*.

Das *SUVH2* hat einen Dosis-abhängigen Effekt auf das Transgen-Silencing (LUCIFERASE). Bei Überexpression von *SUVH2* erfolgt ein verstärktes Silencing der LUCIFERASE. In den Antisenselinien weist LUCIFERASE eine erhöhte Aktivität auf.

Der "mini-Pflanzen" Phänotyp wurde für die funktionelle Analyse der SET- und YDG-Domäne von *SUVH2* mittels EMS-Mutagenese genutzt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die SET-Domäne eine HMTase-Aktivität für die Histone H3K9, H3K27 und H4K20 hat. Der N-Terminus von *SUVH2* dient der Erkennung der Targetsequenzen.

Es wurde die Expression der Gene SUVH1 bis SUVH9 während einer Virusinfektion mit dem Potyvirus TuMV (*Turnip Mosaic Virus*) analysiert, wobei während einer Infektion *SUVH2* stärker exprimiert wird.

5. Anhang

5.1. Primerliste

Gene	Name	Sequenz
<i>OsSET1</i>	SET1-9	GCT CGC TTT ATG AAC CAC AGC
	SET1-10	ATG TCG GAA GTC CAA AAA CTG CTT
<i>SUVH1</i>	Su1start	ATAGTCGACCGCATGGAAAGAGGTTGGTCAC
	Su1-stop	ATAGTCGACTCCAAATGAGCCACGGCAATACGC
	Su1-Start/NheI	ATAGCTAGCATGGAAAGAAATGGTGGTACA
	Su1-Stop	ATACTCGAGAAATGAGCCACGGCAATACGC
	Su1r908	TAACGCATCAAACCGCATAA
	Su1f592	ACCAAGCTCAGAACCCACCG
	<i>SUVH2</i>	Su2Start
Su2Stop		ATAGTCGACCTAGTTGCAGATGGCGAG
Su2StartNheI		ATAGCTAGCATGAGTACATTGTTACCA
Su2Xho		ATACTCGAGGTTGCAGATGGCGAGCTTG
Su2-1631B		ATAACATCCCCATTGATTGACAG
mycSalI		ATAGTCGACATGGGCGGACGCGAACAAAAGTTG
2RNAi3X/B		ATAGGATCCCTCGAGGCTCGTTCAC TTCAT
2RNAi5-BamHI F		ATAGGATCCCTCAATCCTCCACCG
2RNAi5X B		ATACTCGAGGGATCCCCCAAACCAGACTTCCCC
2RNAi3BamHI		ATAGGATCCTTTGCTGTGGGGAAGTCT
Su2-1290F		GATCAGCAGGACTGGCTGCGAG
Su2r545		TCTCGCTAGGTCTCTCGGTC
EndoSu2-1		TTG AGA CAA CCT CGA AGT AAT GCA AAC
Su2 R 742		TGACTGGACCAACTATGTGCTTAT
Su2F 610		CTAATGGCGGAGAGTATGAAGAAT
Su2 R 231		TTCCGATTTCACTTCTAACTTTCC
EndoSu2-81		AGGTGTTGTTTCTGTCTTCGGTTC
EndoSu2- 30		AGGCCGGATCCGATTCGTGACCCG
Su2f527		GACCGACGAGAGACCTAGCGAGA
<i>SUVH3</i>		Su3-337F
	Su3r-657	GCATTTCCATCTTCTCGCTC
<i>SUVH4</i>	Su4r1227	CTCGGCAGTTACACCCAGTT
	Su4f1010	TGGACGCATACCAACGAGTA
<i>SUVH5</i>	Su5f-476	GGTCCATCCTCCAAGCATAA
	Su5r-720	GACCCAAATGGTCTCCAGAA
<i>SUVH6</i>	Su6f-320	TGCCTCTGAAAACGTGAGTG
	Su6r-588	CTAGCGGCTGAGTTTGATCC
<i>SUVH7</i>	Su7f-280	CACAACACATTTGCACCTCC
	Su7r-524	GAATCGAAATCCCACGAGA
<i>SUVH8</i>	Su8f-1103	ATGGTCCTGCTGCTACGAGT
	Su8r-1368	GTCACTTGCCAGCAATCAGA
<i>SUVH9</i>	Su9f-99	GGCCTTTCAACTTCCAAACA □
	Su9r-414	CCTCACTAGCTCCGACGAAC

Gene	Name	Sequenz
<i>T-DNA</i>	LF1	ACCAGCGTGGACCGCTTG
	LR1	GTGGTCCGAAATCGGCAAAATCC
	LF2	GCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTG
<i>T-DNA</i>	LR2	ATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGG
	LF3	GTCAATTTGTTTACACCACAATATATC
	LR3	CACTACGTGAACCATCACCCAAATC
	LF11	GCCTGTATCGAGTGGTGATTTT
	LF87	GGTGTAACAAATTGACGCTTAGA
	LF119	TAATAACACATTGCCGGACGTTTTT
	LR 33	CAAATCACCCTCGATACAGG
	LR 110	TCTAAGCGTCAATTTGTTTACACC
	35S-1HindIII	GAAAGAATGCTAACCCACAGATG
	35sd2fwd	AGGGTAATAT(CT)GGGAAA(CT)
	LR 133	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGT
deg. Primer	Adeg2-2	NGTGCASWGTNTWGAA
	Adeg2	NGTCGASWGANAWGAA
	DegARA1	WGCNAGTNAGWANAAG
	DegARA2	AWGCANGNCWGANATA
<i>MET1</i>	Met1-6f	GTCAGGTATATATTTTCAGATTGTGG
	Met1-1153f	TCTGAACACCTGCCTCACAG
	Met1-6r	TGTATAAGACTGACCTTTCTCTTTG
	Met1-1346r	TGTGACTGAGAACCGCTGTC
	Met1-239f	ATCGTCCAACCAGGAGACTG
	Met1-428r	ATACTCCAATGCTCAACCCG
<i>CMT3</i>	CMT3-16F	AAGAGACCTGCGACAAAGGA
	CMT3-226R	GTGGCTGTACCTCAATCGGT
	CMT3-eF	TGGTCTGTTTTAGTGTCTAGGAATA
	CMT3-eR	GGTCTAAAGATAAATCCTAGGAAAA
<i>ACTIN</i>	Actinf250	ATGGAAAAGATATGGCATCACAC
	Actinr520	GAAGAGCATACCCCTCGTAGATT
<i>GFP</i>	GFP-NheIStop	<u>GCTAGCTTATTGTATAGTTCATCC</u>
	GFP-Start	<u>GGATCCATGAGTAAAGGAGAAG</u>
<i>DDM1</i>	DDM1f	GAGATCTCTACCCTCCTGT
	ddm1-2dRSa	TGAGCTACGAGCCATGGGTTTGTGAAACGTA
<i>EZA1</i>	EZA1F1239	GCGTGAGGTCCCAATTCTAA
	EZA1R1479	ACCATCATGGACCGAATTGT
<i>ATX5</i>	ATX5F105F	TTGAAGCCAACCTGATGTGGA
	ATX5R292R	TTGCAACACTGAGTGCATGA
<i>ASH1</i>	ASH1F211	GCCACTAAGAAGGGAAGCCT
	ASH1R406	CACCACAGAGACAACGCCT
<i>NPTII</i>	NptIIF	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
	NptIIR	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG
<i>ATHILA</i>	Athila 817	TGAGGATGGGATAGAATAG
	Athila back	ATTAATCCCTAAAACACTATCTT

Gene	Name	Sequenz
<i>TNP2</i>	TNP2F97	GAAGCCATAGTGGCGTTGTA
	TNP2R382	CCGGAGTTTCAAGAACAGGA
<i>En/Spm</i>	En/SpmF160	CACCAATCACTGGAACATGC
	En/SpmR364	GTGCCTTCACGGTAGAGAGC
<i>Ta11</i>	Ta11F221	CGCAAAGGTAATGAGGCAT
	Ta11R481	CGCAGCAAAGTGGTCTACAA
<i>Ac</i>	AcF381	GATTACAAAGCCGGTCGAAG
	AcR485	ACTGAAACCGGAATGGTGAG
<i>Ty3</i>	Ty3F338	TGCTCCTTCGTAAAGGGAGA
	Ty3R521	ACCCCGTCTGCATGATACTC
<i>Dell-46</i>	Dell-2212F	GTGACGCCTCAGTCTGTGAA
	Dell-2368R	CAAAGCTTCTTGGGCTGAC
<i>Tnt1</i>	Tnt1F1884	CCTTGATCCAAAAGGCAAAA
	Tnt1R2082	AACAGAAAGCGCAGGAGTGT
<i>PttA1</i>	PttA1F84	ATCCTCAGCCACTGTTGGTC
	PttA1R321	CTGATCATCTCCGGTCTGGT
<i>Luciferase</i>	Lu1626B	GGCCTTTATGAGGATCTCTCTG
	LU8F	ACGCCAAAAACATAAAGAAAGG
	lucd2back	AACT(AG)CAACTCC(AG)ATAAAT
<i>GUS</i>	Gus-start	ATAGGATCCATGTTACGTCCTGTAGAAACCC
	Gus-stop	ATAGGATCCTTGTGGCCTCCCTGCTG
	GUS1212	GTGGTGATGTGGAGTATTG
	GUS 1576 rev	ATACTCTTCACTCCACAT
<i>TuMV</i>	TuMV-2841F	TGAAATCTCTAGCGAAGAAGGTG
	TuMV-3200R	TTTTCAATTGGCAAATCTTTCTGT
<i>RPP1-W</i>	RPP1F114	CAGTGGAACCTCATCGCTCA
	RPP1R305	CCAAGCTTCTGCACAATCAA
<i>RPS4</i>	RPS4F287	CGGATGAAGGAACACTCGTT
	RPS4R516	CTTCACCGCCTTCACAATTT
<i>Hcr9-9A</i>	Hcr9-9A285F	CAAGCGAGAAGTGGAGGAAC
	Hcr9-9°511R	CTCACCACCCTTCAAACCAT
<i>Cf-2.1</i>	Cf-2.1F1232F	AGCTTCAGGCCCTGTTGTTA
	Cf-2.1F1444R	TTTCCATCCTGGCCATAGAG
<i>SDE3</i>	SDE3F2934	CTCAAGAAGCCGAGTGGAAC
	SDE3F3163	CTTCCACCCATCAGACCACT
<i>Hcr2-5b</i>	Hcr2-5bF189	GTGGAACAAGGGCATTGACT
	Hcr2-5bR383	AGAAGGAATCTCCCCTTGGA
<i>EDS1</i>	EDS1F287	CATTCCTCTGCTCCGAGAAC
	EDS1R506	CGTTTTAACGTCGGTTCGAT
<i>PR5</i>	PR5F438	ACGACGTGAGCCTCGTAGAT
	PR5R634	GCAACAATACTCCGGCTTGT
<i>PR1</i>	PR1R 268	G TTCAGGTT CAGGTGGAGGA
	PR1R 464	GCCCGTTAGAGTGAACAAGC
<i>Hcr2-0B</i>	HCR20BF1261	ACATTGAAGGCCAAGTACCG
	HCR20BR1495	AAACACCGGGGAATAGAACC

5.4 Reduzierte Transposon Expression in der Linie 35S*::mycSUVH2#5

Beschreibung	Locus	35S*::myc SUVH2#5	suvh2 (SALK N079574)	35S*::SUVH2 as#21
MuDR-like mudrA Protein	At4g18410	0,6	2,7	4,1
mutator-like Transposase	At1g12710	0,4	1,6	1,0
Transposase ähnlich zu Transposase (Tip100)	At3g29763	0,5	0,9	2,5
ähnlich zu Ac Transposase	At1g34240	0,7	2,3	3,2
Mutator-like Transposase ähnlich zu MURA	At2g14030	0,6	1,7	1,5
Mutator-Transposase ähnlich zu MURA Transposase	At2g11560	0,5	2,6	1,7
Mutator-like Transposase ähnlich zu mudrA	At1g35995	0,7	2,5	0,8
Mutator-like Transposase ähnlich zu MURA	At2g07330	0,7	2,9	1,7
ähnlich zu En/Spm-like Transposon	At1g42220	0,4	1,5	0,6
ähnlich zu En/Spm-like Transposon Protein	At2g12220	0,4	1,1	2,4
En/Spm Transposon verwandt zu CACTA/TNP2 Transposon	At2g10630	0,3	3,8	1,2
En/Spm-like Transposon Protein	At2g11540	0,3	2,0	1,0
En/Spm-like Transposon Protein	At2g11690	0,4	2,7	3,0
En/Spm-like Transposon Protein	At2g15090	0,7	5,0	0,5
putative Transposase	At3g30585	0,3	4,7	1,3
putatives Athila Transposon Protein	At4g07700	0,5	4,8	2,4
Athila ORF 1	At1g41797	0,1	1,4	0,9
Athila Retroelement ORF 1	At1g37060	0,3	6,5	8,7
Athila ORF 1	At3g31340	0,4	4,5	1,5
Ty3-gypsy-like Retroelement pol Polyprotein	At2g06190	0,7	2,0	1,6
Ta1-1 non-LTR Retroelement ähnlich Reverse Transkriptase	At3g31430	0,5	1,6	1,7
put. Retrotransposon, RIRE1	At4g10460	0,7	1,6	1,4
copia-like Retroelement pol Polyprotein	At2g19840	0,7	11,9	1,7
putatives Ta1 1-like non-LTR Retroelement	At2g17910	0,1	1,7	0,2

Beschreibung	Locus	35S*:: <i>myc</i> <i>SUVH2#5</i>	<i>suvh2</i> (SALK N079574)	35S*:: <i>SUVH2#21</i>
putative Retroelement gag/pol Polyprotein, Tat-like	At2g11940	0,5	1,7	0,7
putative transposon protein	At4g04280	0,4	1,2	0,8
put. non-LTR Retroelement Reverse Transkriptase	At2g16110	0,5	4,6	0,9
putatives Transposon Protein	At4g07490	0,6	1,4	1,6
putatives Transposon Protein	At4g04230	0,7	4,2	1,0
putatives Transposon Protein	At4g07540	0,7	5,3	2,2
Polyprotein	At1g36120	0,2	1,9	0,4
Polyprotein	At1g41825	0,4	1,0	4,1
Polyprotein	At1g44510	0,4	1,8	0,3
Polyprotein	At1g58889	0,4	1,9	0,8
putatives Retroelement pol Polyprotein	At2g07550	0,6	2,2	0,8
putatives Retroelement pol Polyprotein	At2g10760	0,6	8,0	1,3
putatives Retroelement pol Polyprotein	At2g25230	0,6	3,9	1,2
Transposon Protein ähnlich zu T21B4.1(AF007271)	At4g08605	0,6	2,6	1,6

5.5 Mutanten im *mycSUVH2*

Nummer	Mutante	Aminosäure- Position	Aminosäure-Austausch
1	5EMS 25	101	E/D
2	5EMS 555	312	R/K
3	5EMS 659	325	Y/Stop
4	5EMS 1	341	Frameshift GKSGFGVKNVFWWGF.
5	5EMS 563	346	V/A
6	5EMS 408	373	R/I
7	5EMS 403	506	G/D
8	5EMS 402	543	V/G
9	5EMS 412	582 591	M/T A/L
10	5EMS 739	614 622	L/M F/C
11	5EMS 909	637	G/S
12	5EMS 662	63	E/Q
13	5EMS 620	216	D/N
14	5EMS 724	596	H/Y
15	5EMS 393	187	A/S

5.6 Expressionveränderungen in 35S*::*mycSUVH2#5* Überexpressionspflanzen

5.6.1 Zusammenfassung der reprimierten Gene in 35S*::*mycSUVH2#5*

Beschreibung	Anzahl	Prozent %
Transposon	38	8
Pathogen	45	9
Senescence	39	8
Transport	52	11
Stress	28	6
Entwicklung	10	2
Blüte	9	2
Transkription/Translation	57	11
Stoffwechsel	102	20
unbekannte	114	24
<u>Summe</u>	<u>485</u>	<u>100%</u>

5.6.2 Änderung der Expression einiger Transposons

Beschreibung	35S*:: <i>mycSUVH2#5</i>	35S*:: <i>SUVH2as#21</i>	<i>suvh2</i>
putatives Retroelement Polyprotein del1-46	0,1	0,12	0,6
Retrovirus verwandte pol Polyprotein Tnt1	0,4	3,00	1,10
putative PttA-1 (En/Spm)	0,07	0,8	0,61
Ta1-1 non-LTR Retroelement ähnlich zu retroviralen gag (Nucleocapsid)	0,2	1,5	2,1
Athila Retroelement ORF 1	0,3	0,9	1,4
En/Spm Transposon	0,5	1,8	0,8
Ac-like Transposase (Ac/Ds)	0,9	1,3	0,8

5.6.3 Änderung der Expression einiger an der Pathogenantwort beteiligter Gene

	Beschreibung	35S*:: <i>myc</i> <i>SUVH2#5</i>	35S*:: <i>SUVH2</i> <i>as#21</i>	<i>suvh2</i>
At1g33960	AIG1, RPS2- und avrRpt2-abh. frühe Induktion nach Infektion mit <i>Pseudomonas</i>	0,01	0,62	0,61
At3g25020	Resistenz Protein, Leucine Rich Repeat 24 Kopien	0,07	0,99	0,47
At1g63660	ähnlich zu RPP1-WsC	0,07	1,63	0,65
At4g13900	ähnlich zu Hcr9-9A	0,9	1,12	0,76
At4g16960	ähnlich zu RPP5	0,12	1,09	0,62
At3g53240	ähnlich zu Cf-2.1	0,14	1,72	2,14
At2g21110	disease Resistenz response Protein fungi	0,24	2,59	1,47
At1g72840	disease Resistenz, Apoptosis, <i>tRNA processing</i> TIR-NBS-LRR	0,24	2,33	1,34
At3g23120	ähnlich Hcr2-5b, <i>Leucine Rich Repeat</i> 20 Kopien	0,27	0,81	0,72
	Beschreibung	35S*:: <i>myc</i> <i>SUVH2#5</i>	35S*:: <i>SUVH2</i> <i>as#21</i>	<i>suvh2</i>
At2g15040	Resistenz, Nickel Ionen bindende RNA Komplex	0,33	1,62	1,15
At2g15320	<i>Leucine-Rich Repeat</i> disease Resistenz	0,33	1,30	0,83
At3g51040	Resistenz Protein, CC-NBS-LRR, Shikimat Kinase Aktivität	0,43	1,74	0,82
At5g45250	Rezeptor Aktivität (TIR-NBS-LRR), RPS4	0,45	1,74	0,65
At5g14930	disease Resistenz Protein EDS1	0,46	1,69	0,71
At3g25010	disease Resistenz, Leucine Rich Repeat 23 copies	0,47	1,22	0,70
At3g25930	universal Stress protein (USP)	0,12	0,63	1,56
At5g15450	ähnlich zu HSP100/ClpB	0,29	1,84	0,91
At1g05460	RNA Helikase Aktivität SDE3 virus induced gene silencing VIGS	0,15	0,70	1,73
At4g11850	Pathogen Abwehrantwort (Bakterien)	0,17	1,03	0,75
At3g57260	systemisch notwendiges Resistenzprotein	0,12	0,90	0,65
At3g48030	Aktivität Lipase Klasse 3, Resistenz	0,15	1,35	0,62
At3g50480	RPW 8 Protein, Mehltau	0,22	1,04	0,62
At5g45500	Leucine Rich Repeat LRR	0,41	1,58	0,80
At5g37790	ähnlich zu Pto Kinase Interaktor1 Pti1	0,25	2,31	1,47
At2g17820	Photosynthese Dunkelreaktion Chlorophyll Biosynthese, Pathogen induzierbar	0,37	0,51	1,56
At4g26600	proliferating- Zell nucleolar antigen P120	0,10	1,85	1,53
At5g06040	self-incompatibility Protein	0,17	2,43	4,23
At5g45240	Resistenz Protein, TIR-NBS-LRR, Apoptosis	1,50	0,21	0,63
At5g47280	Resistenz Protein Abwehrantwort NBS-LRR	1,60	0,44	0,52
At4g13880	Protein Hcr2-0B	2,27	0,75	0,19
At3g01420	feebly ähnliches Protein, Zelltod, Pathogenantwort	1,84	0,76	0,09
At4g11650	Abwehrantwort pathogene Bakterien, OSM34	3,97	1,77	0,47
At1g19320	Pathogenese verwandtes Protein 5 PR5	1,53	0,26	0,30
At1g01310	Pathogenese verwandtes Protein1, PR1	3,76	0,56	0,41

6. Literatur

- Aagaard, L.; Schmid, M.; Warburton, P. and Jenuwein, T. (2000): Mitotic phosphorylation of SUVH39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J. Cell Sci.*, **113**, 817-829
- Adams, S.; Vinkenoog, R.; Spielman, M.; Dickinson, H.G. and Scott, R.J. (2000): Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development*, **Vol 127**, Issue 11 2493-2502
- Al-Kaff, N.S.; Covey, S.N.; Kreike, M.M.; Page, A.M.; Pinder, R.; Dale, P.J. (1998): Transcriptional and Posttranscriptional Plant Gene Silencing in Response to a Pathogen. *Science*, **Vol. 279**, 2113- 2115
- Alonso, J.M.; Stepanova, A.N.; Lisse, T.J.; Kim, C.J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D.K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadrinab, D.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C.C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D.E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C.; Ecker, J.R. (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **Vol. 301**, 653- 656
- Alvarez-Venegas, R.; Pien, S.; Sadler, M.; Witmer, X.; Grossniklaus, U. and Avramova, Z. (2003): ATX-1, an *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes. *Current Biology*, **Vol. 13**, 627–637
- Alvarez-Venegas, R. and 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 Research*, **Vol. 33**, No. 16, 5199–5207
- Amedeo, P.; Habu, Y.; Afsar, K.; et al. (2000): Disruption of the plant gene MOM releases transkriptional silencing of methylated genes. *Nature*, **405**, 203-206
- Autran, D.; Huanca-Mamani, W. and Vielle-Calzada, J.P. (2005): Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an Oedipus complex. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 19–25
- Bachman, K.E.; Rountree, M.R. and Baylin, S.B. (2001): Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32282-32287
- Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawicz, B.; Dinesh-Kumar, S. P. (1997): Signaling in Plant-Microbe Interactions, *Science*, **Vol. 276**,
- Bannister, A.J.; Zegerman, P.; Partridge, J.F.; Miska, E.A.; Thomas, J.O.; Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120–124
- Bartee, L.; Malagnac, F. and Bender, J. (2001): *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & Development*, **15**, 1753–1758
- Baumbusch, L.O.; Thorstensen, T.; Krauss, V.; Fischer, A.; Naumann, K.; Assalkhou, R.; Schulz, I.; Reuter, G. and Aalen, R.B. (2001): The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Research*, **Vol.29**, No21, 4319-4333
- Bechthold, N.; Ellis, J. and Pelletier, G. (1993): In planta *Agrobacterium*-mediated Gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Life Sci.*, **316**, 1194-1199
- Beisel, C.; Imhof, A.; Greene, J.; Kremmer, E.; Sauer, F. (2002): Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*, **419**, 857-862

- Bennetzen, J.L. (2000): Transposable element contributions to plant gene and genome Evolution. *Plant Molecular Biology*, **42**, 251-269
- Berg, A.; Meza, T.J.; Mahic, M.; Thorstensen, T.; Kristiansen, K. and Aalen, R.B. (2003): Ten members of the Arabidopsis gene family encoding methyl-CpG-binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, AtMBD11, is crucial for normal development. *Nucleic Acids Research*, Vol. **31**, No.18 5291-5304
- Berger, F. (2003): Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 42-50
- Berger, F. and Gaudin, V. (2003): Chromatin dynamics and Arabidopsis development. *Chr. Research*, **11**, 277-304
- Bernstein, B.E.; Humphrey, E.L.; Erlich, R.L.; Schneider, R.; Bouman, P.; Liu, J.S.; Kouzarides, T. and Schreiber, S.L. (2002): Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *PNAS*, Vol. **99**, 13, 8695–8700
- Botella, M.A.; Parker, J.E.; Frost, L.N.; Bittner-Eddy, P.D.; Beynon, J.L.; Daniels, M.J.; Holub, E.B.; Jones, J.D. (1998): Three genes of the Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell*, **10**(11), 1847-60
- Bottomley, M.J. (2004): Structures of protein domains that create or recognize histone Modifications. *EMBO reports*, Vol. **5**, No 5, 464-469
- Boutet, S.; Vazquez, F.; Liu, J., Beclin, C.; Fagard, M.; Gratias, A.; Morel, J.; Crete, P.; Chen, X. and Vaucheret, H. (2003): *ArabidopsisHEN1*: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology*, Vol. **13**, 843–848
- Breiling, A. and Orlando, V. (2002): SET domain proteins reSET gene expression. *Nature*, Vol. **9**, No. 12, 894-896
- Briggs, S.D.; Bryk, M.; Strahl, B.D.; Cheung, W.L.; Davie, J.K.; Dent, S.Y.; Winston, F.; Allis, C.D. (2001): Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **15**, 3286–3295
- Brzeski, J. and Jerzmanowski, A. (2003): Deficient in DNA Methylation 1 (DDM1) Defines a Novel Family of Chromatin-remodeling Factors. *JBC*, Vol. **278**, No. 2, 823–828
- Burch, B.D.; Nettleton, D. and Voytas, D.F. (2004): Genomic neighborhoods for *Arabidopsis* retrotransposons: a role for targeted integration in the distribution of the Metaviridae *Genome Biology*, **5**, R78
- Byrd, K.N. and Shearn, A. (2003): ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *PNAS*, Vol. **100**, No. 20, 11535–11540
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004): The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development*, **14**, 1–10
- Cao, X.; Jacobsen, S.E. (2002a): Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* **12**, 1138-1144
- Cao, X.; Jacobsen, S.E., (2002b): Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *PNAS*, Vol. **99**, 16491–16498
- Cao, X.; Springer, N.M.; Muszynskii, M.G.; Phillips, R.L.; Kaeppler, S. and Jacobsen, S.E. (2000): Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *PNAS*, Vol. **97**, 4979–4984
- Changhe, Z. C.; Zhang, L.; Duan, J.; Miki, B. and Wua, K. (2005) :HISTONE DEACETYLASE19 Is Involved in Jasmonic Acid and Ethylene Signaling of Pathogen response in Arabidopsis. *The Plant Cell Preview*

- Chang, S. and Pikaard, C.S. (2005): Transcript Profiling in *Arabidopsis* Reveals Complex Responses to Global Inhibition of DNA Methylation and Histone Deacetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **280**, No. 1, 796–804
- Chan, S.W.L.; Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. (2005): GARDENING THE GENOME: DNA METHYLATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Nature Reviews*, Vol. **6**, 351–361
- Chanvivattana, Y.; Bishopp, A.; Schubert, D.; Stock, C.; Moon, Y.H.; Sung, Z.R.; Goodrich, J. (2004): Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, **131**(21), 5263–76
- Chen, W.Y.; Bailey, E.C.; McCure, S.L.; Dong, J.Y. and Townes, T.M. (1997): Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *PNAS*, Vol. **94**, 5798–5803
- Choi, Y.; Harada, J.J.; Goldberg, R.B. and Fischer R.L. (2004): An invariant aspartic acid in the DNA glycosylase domain of *DEMETEER* is necessary for transcriptional activation of the imprinted *MEDEA* gene: *Proc Natl Acad Sci*; **11**; 101(19): 7481–7486.
- Churchill, E.A.; Travers, A.A. (1991): Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Elsevier Science Publishers*, 92–97
- Citterio, E.; Papait, R.; Nicassio, F.; Vecchi, M.; Gomiero, P.; Mantovani, R.; Di Fiore, P.R. and Bonapace, I.M. (2004): Np95 Is a Histone-Binding Protein Endowed with Ubiquitin Ligase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. **24**, No. 6, 2526–2535
- Claus, P.; Schulze, E.; Wisniewski, J.R. (1994): Insect Proteins Homologous to Mammalian High Mobility Group Proteins I/Y (HMGI/Y). *J. Biol. Chem.*, **269**, 1–7
- Cooper, B. (2001): Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *The Plant Journal*, **26**, 3, 339–349
- Cui, H. and Fedoroff, N.V. (2002): Inducible DNA Demethylation Mediated by the Maize *Suppressor-mutator* Transposon-Encoded TnpA Protein. *The Plant Cell*, Vol. **14**, 1–17
- Czernin, B.; Melfi, R.; McCabe, D.; Seitz, V.; Imhof, A., Pirota, V. (2002): *Drosophila* enhancer of zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal polycomb sites. *Cell*, **111**, 185–196
- Dalmay, T. et al. (2001): SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional Gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **20**, 2069–2077
- Diaz-Pendon, J.A.; Truniger, V.; Nieto, C.; Garcia-Mas, J.; Bendahmane, A. and Aranda, M.A. (2004): Advances In Understanding Recessive Resistance To Plant Viruses. *Molecular Plant Pathology*, **5** (3) , 223–233
- Ding, H.F.; Bustin, M. and Hansen, U. (1997): Alleviation of Histone H1-Mediated Transcriptional Repression and Chromatin Compaction by the Acidic Activation Region in Chromosomal Protein HMG- 14. *Mol. and cellular Biology*, 5843–5855
- Dixon, M.S.; Golstein, C.; Thomas, C.M.; van der Biezen E.A. and Jones, J.D.G. (2000): Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *PNAS*, Vol. **97**, no. 16, 8807–8814
- Dunoyer, P.; Thomas, C.; Harrison, S.; Revers, F. and Maule, A. (2004): A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates *Potyvirus* Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. *Journal Of Virology*, Vol. **78**, No. 5, 2301–2309
- Ebert, A.; Schotta, G.; Lein, S.; Kubicek, S.; Krauss, V.; Jenuwein, T. and Reuter, G. (2004): Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes & Development*, **18**, 2973–2983

- Ebbs, M.L.; Bartee, L.; Bender, J. (2005): H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. *Mol. Cell Biol.*; **25**(23), 10507-10515
- Fass, E.; Shahar, S.; Zhao, J.; Zemach, A.; Avivi, Y. and Grafi G. (2002): Phosphorylation of Histone H3 at Serine 10 Cannot Account Directly for the Detachment of Human Heterochromatin Protein 1 from Mitotic Chromosomes in Plant Cells. *THE Journal of Biological Chemistry*, Vol. **277**, No. 34, 30921–30927
- Ferrier-Cana, E.; Macadre, C.; Seignac, V.; David, P.; Langin, T. Geroy, V. (2005): Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC–NBS–LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet.*, **110**, 895–905
- Feschotte, C.; Jiang, N. and Wessler, S.R. (2002): PLANT TRANSPOSABLE ELEMENTS: WHERE GENETICS MEETS GENOMICS. *Nature Reviews*, Vol. **3**, 329-341
- Finnegan, E.F.; Genger, R.K.; Peacock, W.J. et al. (1998): DNA methylation in plants. *Annu Rev. Plant Physiol*, **49**, 223-247
- Finnegan, E.J. and Kovac, K.A. (2000): Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, **43**, 189–201
- Finnegan, E.J.; Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1996): Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. **93**, 8449–8454
- Fischer, A. (2005): Funktionelle Charakterisierung neuer SET-Domänenproteine in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation
- Fischle, W.; Wang, Y.; Jacobs, S.A.; Kim, Y.; Allis, C.D.; Khorasanizadeh, S. (2003): Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.*, **17**, 1870-1881
- Fornieris, F.; Bindaa, C.; Vanonib, M.A.; Mattevia, A.; Battagliolic, A. (2005): Histone demethylation catalysed by LSD1 is a .avin-dependent oxidative process. *FEBS Letters*, **579**, 2203–2207
- Franz, P.; Soppe, W. & Schubert, I. (2003): Heterochromatin in interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*, **11**, 227-240
- Freitag, M. and Selker, E.U. (2005): Controlling DNA methylation: many roads to one Modification. *Current Opinion in Genetics & Development*, **15**, 191–199
- Fuks, F.; Burgers, W.A.; Brehm, A.; Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000): DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genet.*, **24**, 88-91.
- Fuks, F.A.; Hurd, P.J.; Deplus, R. and Kouzarides, T. (2003): The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, Vol. **31**, No. 9, 2305-2312
- Furner, I.J.; Sheikh, M.A. and Collett, C.E. (1998): Gene Silencing and Homology-Dependent Gene Silencing in Arabidopsis: Genetic Modifiers and DNA Methylation *Genetics*, **149**, 651–662
- Gao, X.; Havecker, E.R.; Baranov, P.V.; Atkins, J.F. and Voytas, D.F. (2003): Translational recoding signals between gag and pol in diverse LTR retrotransposons. *RNA*, **9**, 1422-1430
- Gaudin, V.; Libault, M.; Pouteau, S.; Juul, T.; Zhao, G.; Lefebvre, D. and Grandjean, O. (2001) Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in Arabidopsis. *Development*, **128**, 4847–4858
- Gehring, M.; Choi, Y. and Fischer, R.L. (2004): Imprinting and Seed Development. *The Plant Cell*, Vol. 16, 203–213

- Gendall, A. R.; Levy, Y. Y.; Wilson, A. and Dean, C. (2001): The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell*, **107**, 525-535
- Gendrel, A.V. and Colot, V. (2005): *Arabidopsis* epigenetics: when RNA meets chromatin. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 142–147
- Gendrel, A.V.; Lippman, Z.; Yordan, C.; Colot, V.; Martienssen, R.A. (2002): Dependence of Heterochromatic Histone H3 Methylation Patterns on the *Arabidopsis* Gene *DDM1*. *Science*, Vol. **297**, 1871-1873
- Goldbach, R.; Bucher, E.; Prins, M. (2003): Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research*, **92**, 207-212
- Goodrich, J.; Puangsomiee, P.; Martin, M.; Long, D.; Meyerowitz, E. and Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*, **386**, 44–51.
- Greil, F.; Kraan, I.; Delrow, J.; Smothers, J.F.; Wit, E.; Bussemaker, H.J.; Driel, R.; Henikoff, S. and Steensel, B. (2003): Distinct HP1 and SU(VAR)3-9 complexes bind to sets of Developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes & Development*, **17**, 2825-2838
- Grasser, K.D. (1995): Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *Plant Journal*, **7**(2), 185- 192
- Grossniklaus, U.; Vielle-Calzada, J.P.; Hoepfner, M.A.; Gagliano, W.B. (1998): Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA a Polycomb Group Gene in Arabidopsis. *Science*, Vol. **280**, 446-450
- Grunau, C.; Clark, S.J. and Rosenthal, A. (2001): Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids research*, Vol. **29**, No13, e65
- Guitton, A.E. and Berger, F. (2005): Control of reproduction by Polycomb Group complexes In animals and plants. *Int. J. Dev. Biol.*, **49**, 707-716
- Guo, H.S. and Garcya, J.A. (1997): Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **10**,160-170
- Hammond-Kosak, K.E. and Parker, J.E. (2003): Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 177–193.
- He, Y. and Gan, S. (2002): A Gene Encoding an Acyl Hydrolase Is Involved in Leaf Senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. **14**, 805–815
- He, Y.H.; Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (2004): Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science*, **302**, 1751–1754.
- Henikoff, S. and Comai, L. (1998): A DNA Methyltransferase Homolog With a Chromodomain Exists in Multiple Polymorphic Forms in Arabidopsis. *Genetics*, **149**, 307–318
- Hirochika, H.; Okamoto, H. and Kakutani, T. (2000): Silencing of Retrotransposons in Arabidopsis and Reactivation by the *ddm1* Mutation. *The Plant Cell*, Vol. **12**, 357–368
- Hofius, D. (2003): Identifizierung molekularer Faktoren des plasmodesmalen Makromolekül- und Assimilattransportes in Pflanzen.
- Hofmann, I. (2004): Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressor-mutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*.
- Hsieh, T.; Hakim, O.; Ohad, N. and Fischer, R.L. (2003): From flour to flower: how Polycomb group proteins influence multiple aspects of plant development. *Trends in Plant Science*, Vol. **8**, No.9, 439-454

- Huang, S.; Litt, M. and Felsenfeld, G (2005): Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes & Development*, **19**, 1885–1893
- Hu, X. and Reddy, A.S.N. (1997): Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology*, **34**, 949–959
- Ivanova, A.V.; Bonaduce, M.J.; Ivanov, S.V. & Klar, A.J.S. (1998): The chromo and SET domains of the Clr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature*, Vol.**19**, 192- 195
- Jackson, J.P.; Lindroth, A.M.; Cao, X. & Jacobsen, S.E. (2002): Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase *Nature*, Vol. **416**, 4
- Jackson, J.P.; Johnson, L.; Jasencakova, Z.; Zhang, X.; Perez Burgos, L.; Singh, P.B.; Cheng, X.; Schubert, I.; Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E. (2004): Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, Vol. **112**, 6, 308-315
- Jacobsen, S.E. and Meyerowitz, E.M. (1997): Hypermethylated SUPERMAN Epigenetic Alleles in *Arabidopsis*. *Science*, Vol. **277**
- Jarvis, P.; Belzile, B. and Dean, C. (1997): Inefficient and incorrect processing of the *Ac* Transposase transcript in *iae I* and wild-type *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **11**(5), 921-931
- Jasencakova, Z.; Soppe, W.J.J.; Meister, A.; Gernand, D.; Turner, B.; Schubert, I. (2003): Histone modification in *Arabidopsis*-high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J.*, **33**, 471-480
- Jeddeloh, J.A.; Stokes, T.L.; Richards, E.J. (1999): Maintenance of genomic methylation Requires a SWI2/SNF2- like protein. *Nat. Gen.*, **22**, 94-97
- Jiang, J.; Birchler, J.A.; Parrott, W.A. and Dawe, R.K. (2003): A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science*, Vol. **8**, No.12, 570-576
- John, I.; Hackett, R.; Cooper, W.; Drake, R.; Farrell, A. and Grierson, D. (1997): Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* **33**, 641–651
- Johnson, L.; Mollah, S.; Garcia, B.A.; Muratore, T.L.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. and Jacobsen, S.E. (2004): Mass spectrometry analysis of *Arabidopsis* histone H3 reveals Distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Research*, Vol. **32**, No. 22, 6511–6518
- Johnson, L.M.; Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002): Interplay between Two Epigenetic Marks: DNA Methylation and Histone H3 Lysine 9 Methylation. *Current Biology*, Vol. **12**, 1360–1367
- Jones, D.A.; Brading, P.; Dixon, M.; Hammond-Kosack, K.; Harrison, K.; Hatzixanthis, K.; Parniske, M.; Piedras, P.; Torres, M.; Tang, S.; Thomas, C.; Jones, J.D. (1998): Molecular, genetic and physiological analysis of *Cladosporium* resistance gene function in tomato. *Symp Soc Exp Biol.*, **51**, 111-113
- Kakutani, T.; Munakata, K.; Richards, E.J. and Hirochika, H. (1999): Meiotically and Mitotically Stable Inheritance of DNA Hypomethylation Induced by *ddm1* Mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **151**, 831–838
- Kaneko, Y.; Inukai, T.; Suehiro, N.; Natsuaki, T.; Masuta, C. (2004): Fine genetic mapping of the TuNII locus causing systemic veinal necrosis by turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet*, **110**, 33–40
- Kato, M.; Takashima, K. and Kakutani, T. (2004): Epigenetic control of CACTA Transposon Mobility in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **168**, 961-969

- Kato, M.; Miura, A.; Bender, J.; Jacobsen, S.E. and Kakutani, T. (2003): Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in *Arabidopsis* spite extensive investigation thereafter on both plants. *Current Biology*, Vol. **13**, 421–426
- Kawabe, A.; Matsunaga, S.; Nakagawa, K.; Kurihara, D.; Yoneda, A.; Hasezawa, S.; Uchiyama, S. and Fukui, K. (2005): Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Molecular Biology*, **58**, 1–13
- Kerk, D.; Bulgrien, J.; Smith, D.W. and Gribskov, M. (2003): Arabidopsis Proteins Containing Similarity to the Universal Stress Protein Domain of Bacterial. *Plant Physiology*, Vol. **131**, 1209–1219
- Kingston, R.E.; Green, M.R. (1994): Modeling eukaryotic transcriptional activation. *Curr. Biol.*, **4**(4); 325-332
- Kinoshita, T.; Harada, J.J.; Goldberg, R.B.; Fischer, R.L. (2001): Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc Natl Acad Sci.*, **98**, 14156-14161
- Kinoshita, T.; Yadegari, R.; Harada, J.J.; Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (1999): Imprinting of the *MEDEA* Polycomb Gene in the Arabidopsis Endosperm. *The Plant Cell*, Vol. **11**, 1945–1952
- Kiyosue, T.; Ohad, N.; Yadegari, R.; Hannon, M.; Dinneny, R.; Wells, D.; Katz, A.; Margossian, L.; Haradas, J.J.; Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (1999): Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. **96**, 4186–4191
- Kohler, C.; Hennig, L.; Bouveret, R.; Gheyselinck, J.; Grossniklaus U. and Grissem, W. (2003): Arabidopsis MS1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO Journal*, Vol. **22**, No. 18, 4804-4814
- Kotake, T.; Takada, S.; Nakahigashi, K.; Ohto, M. and Goto, K. (2003): Arabidopsis *TERMINAL FLOWER 2* gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 555–564.
- Kuzmichev, A.; Nishioka, K.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Reinberg, D. (2002): Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.*, **16**, 2893–2905
- Kwon, S.I.; Koczan, J.M and Gassmann W. (2004): Two Arabidopsis srfr (suppressor of rps4-RLD) mutants exhibit avrRps4-specific disease resistance independent of RPS4. *The Plant Journal*, **40**, 366–375
- Lachner, M.; O’Carroll, N.; Rea, S.; Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001): Methylation of Histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP2 proteins. *Nature*, **410**, 116-120
- Lachner, M.; O’Sullivan, R.J. and Jenuwein, T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.*, **116**, 2117–2124
- Lehnertz, B.; Ueda, Y.; Derijck, A.H.A.; Braunschweig, U.; Perez-Burgos, L.; Kubicek, S.; Chen, T.; Li, E.; Jenuwein, T. and Peters, H.F.M. (2003): *Suv39h*-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at pericentric Heterochromatin. *Current Biology*, Vol. **13**, 1192–1200
- Lellis, A.D.; Kasschau, K.D.; Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (2002): Loss-of-Susceptibility Mutants of *Arabidopsis thaliana* Reveal an Essential Role for eIF(iso)4E during Potyvirus Infection. *Current Biology*, Vol. **12**, 1046–1051
- Leonard, S.; Plante, S.; Wittmann, S.; Daigneault, N.; Fortin, M. and Laliberte, J. (2000): Complex Formation between Potyvirus VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity. *Journal of Virology*, Vol. **74**, No. 17, 7730–7737

- Li, E. (2002): Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 662–673
- Linde, M.; Mattiesch, L.; Debener, T. (2004): Rpp1, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor Appl Genet.*, **109**, 1261–1266
- Lindroth, A.M.; Cao, X., Jackson, J.P. et al. (2001): Requirement of CHROMO-METHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077-2080
- Lindroth, A.M.; Shultis, D.; Jasencakova, Z.; Fuchs, J.; Johnson, L.; Schubert, D.; Patnaik, D.; Pradhan, S.; Goodrich, J.; Schubert, I.; Jenuwein, T.; Khorasanizadeh, S. and Jacobsen, S.E. (2004): Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE 3. *EMBO*, 1-11
- Lippman, Z.; May, B.; Yordan, C.; Singer, T.; Martienssen, R. (2003): Distinct Mechanisms Determine Transposon Inheritance and Methylation via Small Interfering RNA and Histone Modification. *PLoS Biology*, Vol. **1**, 3, 419-427
- Lippman, Z.; Gendrel, A.; Black, M.; Vaughn, M.W.; Dedhia, N.; McCombie, W.R.; Lavine, K.; Mittal, V.; May, B.; Kasschau, K.D.; Carrington, J.C.; Doerge, R.W.; Colot, V. & Martienssen, R. (2004): Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, Vol. **430**
- Loidl, P. (2004): A plant dialect of the histone language. *TRENDS in Plant Science*, Vol. **9**, No.2, 84-90
- Lund, A.H. and Lohuizen, M. (2004): Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 239-246
- Luo, M.; Bilodeau, P.; Koltunow, A.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. and Chaudhury, A. M. (1999): Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 296-301
- Lusser, A.; Brosch, G.; Loidl, A.; Haas, H., Loidl, P. (1997): Identification of Maize Histone Deacetylase HD2 as an Acidic Nucleolar Phosphoprotein. *Science*, Vol. **277**, 88-92
- Mager, J.; Montgomery, N.D.; Pardo-Manuel de Villena, F. and Magnuson, T. (2003): Genomic imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nat. Genet.* **33**, 502–507
- Malagnac, F.; Bartee, L. and Bender, J. (2002): An *Arabidopsis* SET domain protein Required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO*, Vol. **21**, 24, 6842-6852
- Marco, A. and Marín, I. (2005): Retrovirus-like elements in plants. *Recent Res. Devel. Plant Sci.*, **3**, 37, 661
- Martienssen, R. (1998): Chromosomal imprinting in plants. *Curr. Opinion in Genetics & Development*, Vol. **8**, 240- 244
- Martienssen, R.A. and Colot, V. (2001): DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi. *Science*, Vol. **293** ,
- Marin, I. and Llorens, C. (2000): Ty3/Gypsy Retrotransposons: Description of New *Arabidopsis thaliana* Elements and Evolutionary Perspectives Derived from Comparative Genomic Data. *Mol. Biol. Evol.*, **17**(7):1040–1049
- Marmorstein, R. (2003): Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. **28**, No.2, 59-62
- Mathieu, O.; Jasencakova, Z.; Vaillant, I.; Gendrel, A.; Colot, V.; Schubert, I. and Tourmente S. (2003): Changes in 5S rDNA Chromatin Organization and Transcription during Heterochromatin Establishment in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. **15**, 2929–2939

- Mathieu, O.; Probst A.V. and Paszkowski J. (2005): Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO*, 1–9
- Matzke, J.M.A. and Matzke, M.A. (1998): Position effects and epigenetic silencing of Plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 142- 148
- Maule, A.; Leh, V. and Lederer, C. (2002): The dialogue between viruses and hosts in compatible Interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**,
- Meijer, A.M.; Van Dijk, E.L.; Hoge, J.H.C. (1996): Novel members of a family of AT hook-containing DNA- binding proteins from rice are identified through their in vitro interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 607- 618
- Mengiste, T.; Amedeo, P. and Paszkowski, J. (1997): High efficiency transformation of Arabidopsis thaliana with a selectable marker gene regulated by the T-DNA1' promotor. *The Plant Journal*, **12**(4), 945- 948
- Meyerowitz, E.M.; Pruitt, R.E. (1986): Characterization of the genome of Arabidopsis thaliana. *J Mol Biol.*, **20**, 187(2), 169-83
- Meyerowitz, E.M. (1989): Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, **27**, 56(2), 263-269
- Meyers, B.C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuang, H. and Michelmore, R.W. (2003): Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 15, 809–834
- Milne, T.A.; Briggs, S.D.; Brock, H.W.; Martin, M.E.; Gibbs, D.; Allis, C.D. (2002): MLL Targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promotor. *Mol. Cell*, **10**, 1107-1117
- Min, J.; Zhang, Y.; Xu, R.M. (2003): Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev.*, **17**, 1823-1828
- Mindrinos, M.; Katagiri, F.; Yu, G.L. and Asubel, F.M. (1994): The A. thaliana disease resistance gene RPS encodes a protein containing nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, **78**, 1089-1099.
- Mittelsten Scheid, O.; Afsar, K. and Paszkowski, J. (1998): Release of epigenetic silencing by Trans-acting mutations in arabidopsis. *PNAS*, Vol. **95**, 632-637
- Mittelsten Scheid, O.; Jakovleva, L.; Afsar, K.; Moluszynska, J. and Paszkowski, J. (1996): A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, Vol. **93**, 7114-7119
- Mittelsten Scheid, O.; Probst, A.V.; Afsar, K. et al. (2002): Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Nature*, **411**, 212-214
- Miura, A.; Kato, M.; Watanabe, K.; Kawabe, A.; Kotani, H. and Kakutani, T. (2003): Genomic localisation of endogenous mobile CACTA family transposons in natural variants of Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. and Genomics*, 101007
- Miura, A. et al. (2001): Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature*, **411**, 212–214
- Moreno, M.; Bernal, J.J.; Jimenez, I. and Guez-Cerezo, E. (1998): Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *Journal of General Virology*, **79**, 2819–2827
- Mouradov, A.; Cremer, F. and George Coupland (2002): Control of Flowering Time: interacting Pathways as a Basis for Diversity. *The Plant Cell*, 111–130
- Muller, J.; Hart, C.M.; Francis, N.J.; Vargas, M.L.; Sengupta, A.; Wild, B.; Miller, E.L.; O'Connor, M.B.; Kingston, R.E.; Simon, J.A. (2002): Histone methyltransferase activity of a Drosophila polycomb group repressor complex. *Cell*, **111**, 197-208.

- Nagaki, K.; Talbert, P.B.; Zhong, C.X.; Dawe, R.K.; Henikoff, S. and Jiang, J. (2003): Chromatin Immunoprecipitation Reveals That the 180-bp Satellite Repeat Is the Key Functional DNA Element of *Arabidopsis thaliana* Centromeres. *Genetics*, **163**, 1221–1225
- Nakayama, J.; Rice, J.D.; Strahl, B.D.; Allis, C.D. and Grewal, S.I.S. (2001): Role of Histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113
- Nakamura, T.; Mori, T.; Tada, S.; Krajewski, W.; Rozovskaia, T.; Wassell, R.; Dubois, G.; Mazo, A.; Croce, C.M.; Canaani, E. (2002): ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**, 1119–1128
- Naumann, K.; Fischer, A.; Hofmann, I.; Krauss, V.; Phalke, S.; Irmeler, K.; Hause, G.; Aurich, C.A.; Dorn, R.; Jenuwein, T. and Reuter, G. (2005): Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. The *EMBO Journal*, **24**, 1418–1429
- Nislow, C.; Ray, E. and Pillus, L. (1997): *SET1*, A Yeast Member of the Trithorax family, Functions in Transcriptional Silencing and Diverse Cellular Processes. *Mol. Bio. of Cell*, Vol. **8**, 2421- 2436
- Nowak, S.J. and Corces V.G. (2004): Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. www.sciencedirect.com, doi:10.1016
- Ohad, N.; Yadegari, R.; Margossian, L.; Hannon, M.; Michaeli, D.; Harada, J. J.; Goldberg, R.B. and Fischer, R. L. (1999). Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell*, **11**, 407-416.
- Okamoto, H. and Hirochika, H. (2001): Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science*, Vol. **6**, No.11, 527- 534
- Pandey, R.; Müller, A.; Napoli, C.A.; Selinger, D.A.; Pikaard, C.S.; Richards, E.J.; Bender, J.; Mount, D.W. and Jorgensen, R.A. (2002): Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, Vol. **30**, No. 23, 5036-5055
- Panter, S.N.; Hammond-Kosack, K.E.; Harrison, K.; Jones, J.D.; Jones, D.A. (2002): Developmental control of promoter activity is not responsible for mature onset of Cf-9B mediated resistance to leaf mold in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**(11), 1099-1107
- Pappas, J.D.L.; Frisch, R. and Weinreich, M. (2004): The NAD⁺-dependent Sir2p histone deacetylase is a negative regulator of chromosomal DNA replication. *Genes & Development*, **18**, 769–781
- Parker, J.E.; Coleman, M.J.; Szabò, V.; Frost, L.N.; Schmidt, R.; van der Biezen, E.A.; Moores, T.; Dean, C.; Daniels, M.J. and Jones, J.D.G. (1997): The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell*, **9**, 879–894.
- Parker, J.E.; Holub, E.B.; Frost, L.N.; Falk, A.; Gunn, N.D. and Daniels, M.J. (1996): Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell*, **8**, 2033–2046.
- Paszkowski, J. and Whitham, S.A. (2001): Gene silencing and DNA methylation processes *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 123–129
- Peng, J.Y.; Li, Z.H.; Xiang, H.; Huang, J.H.; Jia, S.H.; Miao, X.X.; Huang, Y.P. (2005): Preliminary studies on differential defense responses induced during plant Communication. *Cell Research*, **15**(3), 187-192

- Pereira, V. (2004): Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome. **Vol. 5**, 10, R79
- Poirier, G.M.; Anderson, G.; Huvar, A.; Wagaman, P.C.; Shuttleworth, J.; Jenkinson, E.; Jackson, M.R.; Peterson, P.A.; Erlander, M.G. (1999): Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1) is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants. *J Immunol.*, **1**;163(9):4960-9
- Probst, A.V.; Fagard, M.; Proux, F.; Mourrain, P.; Boutet, S.; Earley, K.; Lawrence, R.J.; Pikaard, C.S.; Murfett, J.; Furner, I.; Vaucheret, H. and Mittelsten Scheid, O. (2004): Arabidopsis Histone Deacetylase HDA6 Is Required for Maintenance of Transcriptional Gene Silencing and Determines Nuclear Organization of rDNA Repeats. *The Plant Cell*, Vol. **16**, 1021–1034
- Probst, A.V.; Fransz, P.F.; Paszkowski, J. and Mittelsten Scheid, O. (2003): Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant Journal*, **33**, 743-749
- Probst, A.V.; Mittelsten Scheid, O.; Afsar, K. et al. (2002): Transcriptional reactivation can modify or maintain properties and organization of heterochromatin. *Plant J.*
- Ramsahoye, B.H.; Biniszkiwicz, D.; Lyko, F.; Clark, V.; Bird, A.P. and Jaenisch, F. (2000): Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *PNAS*, Vol. **97**, No. 10, 5237–5242
- Rea, S. et al. (2000): Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyl-Transferases. *Nature*, **406**, 593-599
- Redei, G.P. (1975): Arabidopsis as a genetic tool. *Annu Rev Genet.*, **9**, 111-27
- Reik, W. and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 21–32.
- Richards, E.J. and Elgin, S.C.R. (2002): Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects. *Cell*, Vol. **108**, 489–500
- Riechmann, J.L.; Lain, S. and Garcia, J.A. (1992): Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.*, **73**,1–16
- Rios, G. et al. (2002): Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-Radioactive detection of T-DNA tagged genes. *The Plant Journal*, **32**, 243-253
- Robyr, D.; Suka, Y.; Xenarios, I.; Kurdistani, S.K.; Wang, A.; Suka, N. and Grunstein, M. (2002): Microarray Deacetylation Maps Determine Genome-Wide Functions for Yeast Histone Deacetylases. *Cell*, Vol. **109**, 437–446
- Roguev, A.; Schaft, D.; Shevchenko, A.; Pijnappel, W.M.; Wilm, M.; Aasland, R.; Stewart, A.F. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an *Ash2* homologue and methylates histone 3 lysine 4. *Embo J*, **20**, 7137–7148
- Rooney, H.C.; Van't Klooster, J.W.; van der Hoorn, R.A.; Joosten, M.H.; Jones, J.D.; de Wit, P.J. (2005): Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, **308**(5729), 1783-6
- Round, E.K.; Flowers, S.K. and Richards, E.J. (1997): Arabidopsis thaliana Centromere Regions: Genetic Map Positions and Repetitive DNA Structure. *Genome Research*, **7**, 1045-1053
- Rozenblatt- Rosen, O.; Rozovskaia, T.; Burakov, D.; Sedkov, Y.; Tillib, S.; Blechman, J.; Nakamura, T.; Croce, C.M.; Mazo, A. and Canaani, E. (1998): The C-terminal SET domains of ALL- and TRITHORAX interact with INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *PNAS*, Vol. **95**, 4152- 4157
- Ruffner, H.; Joazeiro, C.A.P.; Hemmati, D.; Hunter, T. and Verma, I.M. (2001): Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc.Natl. Acad.Sci.*, **98**, 5134-5139

- Sasaki, T. et al.: Toward cataloguing all rice genes (1994): large scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. *The Plant Journal*, **6**(4): 615- 624
- Scebba, F.; Bernacchia, G.; Bastiani, M.; Evangelista, M.; Cantoni, R.M.; Cella, R.; Locci, M.T. and Pitto, L. (2003): *Arabidopsis* MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization. *Plant Molecular Biology*, 1–17
- Schotta, G.; Ebert, A.; Krauss, V.; Fischer, A.; Hoffmann, J.; Rea, S.; Jenuwein, T.; Dorn, R. and Reuter, G. (2002): Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO*, Vol. **21**, No 5. 1121-1131
- Schotta, G.; Lachner, M.; Sarma, K.; Ebert, A.; Sengupta, R.; Reuter, G.; Reinberg, D. and Jenuwein, T. (2004): A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin, *Genes & Development*, **18**,1251–1262
- Sessions et al (2002): A High-Troughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell*, Vol. **14**, 2985- 2994
- Seo, J.; Kim, J. and Kim, M. (2001): Cloning of Androgen-inducible Gene 1 (AIG1) from Human Dermal Papilla Cells. *Mol. Cells*, Vol. **11**, No. 1, 35-40
- Shen, W.H. (2001): NtSET1, a member of a newly identified subgroup of plant SET-domain-containing proteins, is chromatin associated and its overexpression inhibits tobacco plant growth. *The Plant Journal*, **28**, 4, 371- 383
- Shen, W.H. and Meyer, D. (2004): Ectopic Expression of the NtSET1 Histone Methyltransferase Inhibits Cell Expansion, and Affects Cell Division and Differentiation in Tobacco Plants. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 11, 1715- 1719
- Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstone, L.R.; Cole, P.A.; Casero, R.A. (2004): Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*, Vol. **119**, 941-953
- Singer, T.; Yordan, C. & Martienssen, R. A. (2001): Robertson's *Mutator* transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *DECREASE IN DNA METHYLATION (DDM1)*. *Genes Dev.* 15, 591–602
- Shirano, Y.; Kachroo, P.; Shah, J. and Klessig, D.F. (2002): A Gain-of-Function Mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 Receptor–Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat Type R Gene Triggers Defense Responses and Results in Enhanced Disease Resistance. *The Plant Cell*, Vol. **14**, 3149–3162
- Smith, C.L.; Horowitz-Scherer, R.; Flanagan, J.F.; Woodcock, C.L. and Peterson, C.L. (2003): Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nature structural biology*, Vol. **10**, no 2, 141-146
- Soppe, W.J.J.; Jasencakova, Z.; Houben, A. et al. (2002): DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO*, **21**, 6549-6559
- Spada, F.; Vincent, M. & Thompson, E.M. (2000): Plasticity of histone modifications across the invertebrate to vertebrate transition: histone H3 lysine 4 tri-methylation in heterochromatin: *Chromosome Research*, **13**, 57–72
- Springer, N.M.; Napoli, C.A.; Selinger, D.A.; Karen, R.P.; Cone, C.; Chandler, V.L.; Kaeppler, H.F. and Kaeppler, S.M. (2003): Comparative Analysis of SET Domain Proteins in Maize and Arabidopsis Reveals Multiple Duplications Preceding the Divergence of Monocots and Dicots. *Plant Physiology*, Vol. **132**, 907–925
- Stan, T.; Brix, J.; Schneider-Mergener, J.; Pfanner, N.; Neupert, W. and Rapaport, D. (2003): Mitochondrial Protein Import: Recognition of Internal Import Signals of BCS1 by the TOM Complex. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. **23**, No. 7, 2239–2250

- Strichman-Almashanu, L.Z.S.; Bustin, M. and Landsman, D. (2003): Retroposed Copies of the HMG Genes: A Window to Genome Dynamics. *Genome Research*, **13**, 800-812
- Swaney, S.; Powers, H.; Goodwin, J.; Rosales, L.S. and Dougherty, W.G. (1995): RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **8**, 1004-1011.
- Takeda, S.; Tadele, Z.; Hofmann, I.; Probst, A.V.; Angelis, K.J.; Kaya, H.; Takashi, A.; Tesfaye, M.; Mittelsten Scheid, O.; Shibahara, K.; Scheel, D. und Paszkowski, J. (2004): BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Development*, **18**, 782- 793
- Papa, C.M.; Springer, N.M.; Muszynski, M.G.; Meeley, R. and Kaeppler, S.M. (2001): *Maize Chromomethylase Zea methyltransferase2 is required for CpNpG Methylation. The Plant Cell*, **Vol. 13**, 1919–1928
- Tamaru, H. & Selker, E.U. (2001): A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **Vol. 414**, 277- 283
- Tamaru, H.; Zhang, X.; McMillen, D.; Singh, P.B.; Nakayama, J.; Grewal, S.I.; Allis, C.D.; Cheng, X. & Selker, E.U. (2003): Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *neurospora crassa*. *Nature genetics*, **Vol. 34**, 75-79
- Tang, X.; Xie, M.; Kim, Y.J.; Zhou, J.; Klessig, D.F. and Martin, G.B. (1999): Overexpression of *Pto* Activates Defense Responses and Confers Broad Resistance. *The Plant Cell*, **Vol. 11**, 15–29
- Tariq, M. and Paszkowski, J. (2004): DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics*, **Vol. 20**, No.6, 244- 251
- Tariq, M.; Habu, Y. & Paszkowski, J. (2002): Depletion of MOM1 in non-dividing cells of *Arabidopsis* plants releases transcriptional gene silencing. *EMBO reports*, **Vol. 3**, No. 10, 951–955
- Tariq, M.; Saze, H.; Probst, A.V.; Lichota, J.; Habu, J. and Paszkowski, J. (2003): Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *PNAS*, **Vol. 100**, No. 15, 8823–8827
- Tachibana, M.; Sugimoto, K.; Fukushima, T. and Shinkai, Y. (2001): Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* **276**, 25309–25317.
- Tachibana, M.; Sugimoto, K.; Nozaki, M. et al. (2002): G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.*, **16**, 1779–1791.
- Thomas, C.M.; Dixon, M.S.; Parniske, M.; Golstein, C.; Jones, J.D. (1998): Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*, **29**; 353(1374), 1413-1424
- Thompson, H.L.; Schmidt, R. and Dean, C. (1996): Identification and distribution of seven classes of middle-repetitive DNA in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucl. Acids Research*, **Vol. 24**, No.15, 3017-3022
- Tissier, A.F.; Marillonnet, S.; Klimyuk, V.; Patel, K.; Torres, M.A.; Murphy, G. and Jones, J.D.G. (1999): Multiple Independent Defective *Suppressor-mutator* Transposon Insertions in Arabidopsis: A Tool for Functional Genomics. *The Plant Cell*, **Vol. 11**, 1841–1852
- Tör, M.; Brown, D.; Cooper, A.; Woods-Tör, A.; Sjölander, K.; Jones, J.D.G. and Holub, E.B. (2004): Arabidopsis Downy Mildew Resistance Gene RPP27 Encodes a Receptor-Like Protein Similar to CLAVATA2 and Tomato Cf-9. *Plant Physiology*, **Vol. 135**, 1100-1112,

- Tran, R.K.; Henikoff, J.G.; Zilberman, D.; Ditt, R.F.; Jacobsen, S.E. and Henikoff, S. (2005): DNA Methylation Profiling Identifies CG Methylation Clusters in *Arabidopsis* Genes. *Current Biology*, Vol. **15**, 154–159
- Tripoulas, N.; Lajeunesse, D.; Gildea, J. and Shearn, A. (1996): The *Drosophila ash1* Gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, Contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics*, **143**, 913-928
- Tschiersch, B.; Hofmann, A.; Krauss, V.; Dorn, R.; Korge, G. and Reuter, G. (1994): The protein encoded by the *Drosophila* position effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.*, **13**, 3822–3831
- Van Blokland, R.; Lohuis, M.; Meyer, P. (1997): Condensation of chromatin in transcriptional Regions of an inactivated transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Mol.Gen. Genet.* **257**, 1-13
- Van den Ackerveken, G.; Marois, E. and Bonas, U. (1996): Recognition of the bacterial avirulence protein *AvrBs3* occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307- 1316
- Van der Biezen, E.A.; Freddie, C.T.; Kahn, K.; Parker, J.E. and Jones, J.D.G. (2002): *Arabidopsis* RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *The Plant Journal*, **29**(4), 439-451
- Vaucheret, H.; Beclin, C.; Elmayan, T.; Feuerbach, F.; Godon, C.; Morel, J.B.; Mourrain, P.; Palauqui, J.C. and Vernhettes, S. (1998) : Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, **16**(6), 651-659
- Vicient, C.M.; Kalendar, R. and Schulman, A.H. (2001): *Envelope*-Class Retrovirus-Like Elements are Widespread, Transcribed and Spliced, and Insertionally Polymorphic in Plants. *Genome Research*, **11**, 2041–2049
- Vielle-Calzada, J.P.; Thomas, J.; Spillane, C.; Coluccio, A.; Hoepfner, M.A. and Grossniklaus, U. (1999): Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis medea* locus requires zygotic *DDMI* activity. *Genes & Development*, Vol. **13**, No. 22, 2971-2982
- Vongs, A.; Kakutani, T.; Martienssen, R.A. et al. (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science*, **260**, 1926-1928
- Wagner, D. (2003): Chromatin regulation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 20-28
- Wang, J.; Mager, J.; Chen, Y.; Schneider, E.; Cross, J.C.; Nagy, A. and Magnuson, T. (2001): Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat. Genet.*, **28**, 371–375
- Wang, D.; Weaver, N.D.; Kesarwani, M.; Dong, X. (2005): Induction of Protein Secretory Pathway is Required for Systemic Acquired Resistance. *Science*, Vol. **308**, 1036-1041
- Weigel, R.R.; Pfitzner, U.M. and Gatz C. (2005): Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. **17**, 1279–1291
- Whitham, S.A.; Quan, S.; Chang, H.; Cooper, B.; Estes, B.; Zhu, T.; Wang, X. and Hou, Y. (2003): Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, **33**, 271-283
- Willmann, R.M. (2001): Unravelling PTGS: SDE3– an RNA helicase involved in RNA silencing in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science*, Vol. **6**, No.8, 1360-1385
- Winston, F.; Carlson, M. (1992): Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.*, **8**(11), 387-91.
- Wright, D.A. and Voytas, D.F. (2001): *Athila4* of *Arabidopsis* and *Calypso* of Soybean define a Lineage of Endogenous Plant Retroviruses. *Genome Research*, **12**, 122-131

- Xiao, W.; Gehring, M.; Choi, Y.; Margossian, L.; Pu, H.; Harada, J.J.; Goldberg, R.B.; Pennell, R. and Fischer, R.L (2003): Imprinting of the *MEA* Polycomb Gene is controlled by Antagonism between MET1 Methyltransferase and DME Glycosylase.
- Xiao, B.; Wilson, J.R. and Gamblin, S.J. (2003): SET domains and histone Methylation. *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 699–705
- Yan, L.; Youwei, X.; Zhongkai, Z.; Xingqi, H. (2001): Co-suppression in transgenic *Petunia hybrida* expressing chalcone synthase A (*chsA*). *Science in China*, Vol. **44**, No. 6, 661-668
- Yang, X.; Ma, H. and Makaro, C.A. (2004): Characterization of an unusual Ds transposable element in *Arabidopsis thaliana*: insertion of an abortive circular transposition intermediate. *Plant Molecular Biology*, **55**, 905–917
- Yano, S.T.; Panbehi, B.; Das, A. and Laten, H.M. (2005): *Diaspora*, a large family of Ty3-gypsy retrotransposons in *Glycine max*, is an envelope-less member of an endogenous plant retrovirus lineage. *BMC Evolutionary Biology*, **5**, 30, 1-14
- Yoshida, N.; Yanai, Y.; Chen, L.; Kato, Y.; Hiratsuka, J.; Miwa, T.; Sung, Z.R.; Takahashi, S. (2001): EMBRYONIC FLOWER 2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 2471-2481
- Yu, Z.; Wright, S.I. and Bureau, T.E. (2000): Mutator-like elements in *Arabidopsis thaliana*: Struktur, Diversity and Evolution. *Genetics*, **156**, 2019-2031
- Yu, Y.; Dong, D. and Shen, W.H. (2004): Molecular characterization of tobacco SET Domain protein NtSET1 unravels its role in histone methylation, chromatin binding, and segregation. *The Plant Journal*, **40**, 699- 711
- Zemach, A. and Graf, G. (2003): Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-Binding domain (MBD) proteins. *Plant Journal*, **34**, 565- 572
- Zemach, A.; Li, Y.; Wayburn, B.; Ben-Meir, H.; Kiss, V.; Avivi, Y.; Kalchenko, V.; Jackobsen, S.E. and Graf, G. (2005): DDM1 binds *Arabidopsis* Methyl-CpG Binding Domain Proteins and affects their subnuclear Localization, *The Plant Cell*, Preview
- Zhang, S. and Klessig, D.F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *TRENDS in Plant Science*, Vol. **6**, No.11
- Zhang, X. and Gassmann, W. (2003): *RPS4-Mediated Disease Resistance Requires the Combined Presence of RPS4 Transcripts with Full-Length and Truncated Open Reading Frames*. *The Plant Cell*, Vol. **15**, 2333–2342
- Zhang, Y.; Dorey, S.; Swiderski, M. and Jones, J.D.G. (2004): Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *The Plant Journal*, **40**, 213–224
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001): Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, **15**, 2343–2360
- Zhang, X.; Tamaru, H.; Khan, S.I.; Horton, J.R.; Keefe, L.J.; Selker, E.U. and Cheng, X. (2002): Structure of the *Neurospora* SET Domain Protein DIM-5, a Histone H3 Lysine Methyltransferase. *Cell*, Vol. **111**, 117–127
- Zhao, Z. and Shen, W.-H. (2004): Plants contain a high number of proteins showing sequence similarity to the animal SUV39H family histone-methyltransferases. *Ann. Acad. Sci.*,
- Zilberman, D.; Cao, X.; Johansen, L.K.; Xie, Z.; Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004): Role of *Arabidopsis ARGONAUTE4* in RNA-Directed DNA Methylation Triggered by Inverted Repeats. *Current Biology*, Vol. **14**, 1214–1220
- Zilberman, D.; Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716–719

D a n k s a g u n g

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des Themas und die ständige Diskussionsbereitschaft.

A. Fischer und I. Hofmann möchte ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die unzähligen Hilfestellungen und Ratschläge im Laboralltag danken.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Entwicklungsgenetik“ bedanke ich mich für die anregende und angenehme Arbeitsatmosphäre, die unzähligen Hilfestellungen und Ratschläge im Laboralltag.

Für die Unterstützung der zahlreichen Sequenzierungen möchte ich mich bei K. Kittlaus bedanken.

Der Arbeitsgruppe Prof. Humbeck danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung in der Durchführung der Real Time Experimente.

Danken möchte ich abschließend den Menschen, die mir am nächsten stehen und mich auf dem Weg bis hierher immer unterstützt haben, meine Eltern, meine Familie und vor allem Uwe Kiok, der mir über die Jahre Halt und Ziel gegeben hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt haben

Halle, den 25.02.2006

Kathrin Naumann

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kathrin Naumann
Anschrift: Grosse Gosenstr.13
06114 Halle/Saale
Telefon: 0178 2444719
Email: K.Naumann@gmx.org
Familienstand: ledig
Geburtstag: 12.11.1970
Geburtsort: Leipzig

Schul- und Berufsausbildung:

1977 - 1983 POS in Leipzig
1983 - 1987 POS in Hohenprießnitz
Abschluss: 10. Klasse
1987 - 1990 Berufsschule in Leipzig,
Abschluss: Facharbeiter, Industriekauffrau
1990 - 1992 Institut zur Vorbereitung auf das Auslands-
studium in Halle, Abschluss: Abitur

Studium:

1992 - 1997 Studium der Biochemie an der
Martin-Luther-Universität in Halle
Abschluss: Dipl.-Biochemikerin
„Molekulargenetische Analyse des OsSET1-
Gens, eines Reisingens mit Homologie zu
Drosophila-Chromatingenen.“

Berufstätigkeit:

1997 - 2002 Doktorandin am Institut für Genetik, Prof. Dr. G.
Reuter in Halle
2002 - 2005 wissenschaftliche Mitarbeiter am Institut für
Genetik, Prof. Dr. G. Reuter, Weinberweg 10,
06114 Halle

Halle, den 25.02.2006