

Molekulargenetische Analyse
neuer Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing*
in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

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

vorgelegt dem

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

von Christian-Robert Fiedler
geb. am 21.03.1970 in Beuthen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter
 2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
 3. PD Dr. Ortrun Mittelsten Scheid

Halle (Saale), den 19.01.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011200

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011200>]

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Epigenetische Regulation – ein übergeordneter Schalter der Genexpression	1
1.2 Gegenstand der Arbeit	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.2 Medien für die Kultur von Pflanzen	15
2.1.3 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide.....	15
2.1.4 Vektoren.....	15
2.1.5 Verwendete Bakterienstämme	16
2.1.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Extraktion genomischer Pflanzen-DNA	17
2.2.2 Gelelution.....	17
2.2.3 RNA Extraktion	18
2.2.4 Plasmidpräparation (Minipräp).....	18
2.2.5 Reinigung der Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp).....	18
2.2.6 Isolation und Aufreinigung von BAC-DNA.....	19
2.2.7 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	19
2.2.9 <i>In vitro</i> Amplifikation durch PCR (<i>polymerase chain reaktion</i>).....	19
2.2.10 Reverse Transkription.....	19
2.2.11 Klonierung von PCR-Produkten.....	20
2.2.12 Kolonie-PCR.....	20
2.2.13 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	20
2.2.14 Charakterisierung des Methylierungsniveaus mittels <i>Southern</i> -Analyse	21
2.2.15 DNA-Sequenzierung.....	21
2.2.16 Markergestützte Kartierung putativer Mutationsorte	22
2.2.17 <i>LUCIFERASE</i> -Test.....	22
2.2.18 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.2.19 Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.20 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.21 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
2.2.22 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	24

3 Ergebnisse.....	25
3.1 Identifizierung und Analyse neuer <i>met1</i> -Mutantenallele.....	27
3.2 Identifizierung und Analyse eines neuen <i>cmt3</i> -Mutantenallels	33
3.3 Identifizierung und Analyse neuer <i>ddm1</i> -Mutantenallele.....	36
3.4 Identifizierung und Analyse der TGS-Suppressormutante <i>rnr1-h1</i>	41
3.4.1 Komplementation der TGS-Suppressormutante <i>rnr1-h1</i>	45
3.5 Die Mutante 12/1/7 – Mutation im Zentromerbereich.....	48
4 Diskussion	51
4.1 Charakterisierung der <i>met1</i> -Mutanten	51
Morphologische Phänotypen der <i>met1</i> -Mutanten.....	51
Auswirkungen der MET1-Insuffizienz auf die DNA-Methylierung	54
Transgenreaktivierung in <i>met1</i> -Mutanten.....	58
Proteinaktivität von MET1	60
4.2 CMT3-vermittelte Regulation der Genexpression.....	62
4.3 Auswirkungen der DDM1-Insuffizienz auf Phänotyp und DNA-Interaktion	64
DDM1-Insuffizienz führt nicht immer zu morphologischen Veränderungen	64
Die Mutante <i>ddm1-h3</i> – eine dominant negative <i>ddm1</i> -Mutante	66
4.4 Die Mutante <i>rnr1-h1</i> – TGS-Suppression ohne Methylierungsverlust	70
4.5 Die Mutante 12/1/7 – Mutation in der perizentrischen Region	75
5 Zusammenfassung	77
6 Literaturverzeichnis	78
7 Anhang.....	94
7.1 Oligonukleotide	94
7.1.1. SSLP-Primer	94
7.1.2 CAPS-Primer	97
Tabelle 8: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten CAPS-Primer.....	97
7.1.3 Sequenzierungs-, Klonierungs- und Komplementations-Primer	97
7.1.4 RT-PCR-Primer	99
7.2 Chromosomen- und Markerkarte.....	100

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Abb.	Abbildung	HU	Hydroxyurea
abRNA	<i>aberrant</i> RNA	ISW	<i>imitation switch</i>
AdoMet	S-Adenosyl Methionin	Jh.	Jahrhundert
AG	AGAMOUS	K	Lysin
AGO	ARGONAUTE	K _m	Michaelis-Menten-Konstante
Amp	Ampicillin	KYP	KRYPTONITE
Anneal.	<i>Annealing</i>	l	Liter
ARP	<i>actin-related protein</i>	L	Leucin
ARS	<i>autonomously replicating sequence</i>	<i>LacZα</i>	α-Untereinheit der β-Galactosidase
as	<i>antisense</i>	LB	Luria Bertani
AS	Aminosäure	<i>ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
ATP	Adenosintriphosphat	Leu	Leucin
ATPase	Adenosintriphosphatase	Lys	Lysin
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>	M	molar
bp	Basenpaar	m ⁶ A	Adenin-Methylierung in Position 6
bzw.	beziehungsweise	MASC	<i>Ascobulus DNA MTase-like gene</i>
C	Cytosin	Mb	Megabasen
°C	Grad Celsius	MBD	<i>methyl-CpG binding domain</i>
ca.	zirka	m ⁴ C	Cytosin-Methylierung in Position 4
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>	MEA	MEDEA
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	MET1	METHYLTRANSFERASE1
cDNA	komplementäre DNA	mg	Milligramm
cM	centi Morgan	min	Minuten
CMT3	CHROMOMETHYLASE3	MIPS	<i>munich information center for protein sequences</i>
col	<i>Columbia</i>	mJ	Milli-Joule
CSB	<i>cockayne syndrome group B protein</i>	mm	Millimeter
dATP	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat	mM	millimolar
DDM1	<i>decrease in DNA methylation 1</i>	MOM1	<i>morpheus' molecule 1</i>
depc	Diethylpyrocarbonat	mRNA	<i>messenger RNA</i>
d. h.	das heißt	MTase	Methyltransferase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	N	eines der Nukleotide A, C oder T
DNMT	DNA-METHYLTRANSFERASE	NaCl	Natriumchlorid
dNTPs	Desoxyribonukleotide	NaOH	Natriumhydroxid
DRM	<i>domains rearranged methylase</i>	NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>	NOR	<i>Nucleolus organisierende Region</i>
E	Glutaminsäure	NORC	<i>nucleolar chromatin remodelling complex</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat	NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
EMS	Ethylmethansulfonat	N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins
et al.	<i>et alii</i>	p	Phosphat
F _(x)	Filialgeneration	P	Prolin
g	Gravitationskonstante	PASG	<i>proliferation associated SNF2-like gene product</i>
G	Guanin	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
G1-Phase	<i>Gap1 phase</i>	PEV	Positioneffekt-Variation
Gln	Glutamin	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
Glu	Glutaminsäure	PMT	POMBE-METHYLTRANSFERASE
GUS	β-Glucuronidase	PNOS	Nopalinn-Synthase-Promotor
h	Stunde	Pro	Prolin
H3K4	Histon 3 Lysin 4	PSW	Prader-Willi-Syndrom
H3K9	Histon 3 Lysin 9	PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
H3K27	Histon 3 Lysin 27	Q	Glutamin
H3K36	Histon 3 Lysin 36	Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
H4K20	Histon 4 Lysin 20	®	amtlich registriertes Markenzeichen
HCl	Chlorwasserstoff	R1	große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase
HDAC1	Histon-Deacetylase1		
HDA	Histon-Deacetylase		
HDS	<i>homology dependent gene silencing</i>		
HELLS	<i>helicase lymphoid-specific</i>		

R2	kleine Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase	z.B. ZMET2	zum Beispiel <i>ZEA METHYLTRANSFERASE2</i>
rDNA	ribosomale DNA	z.T.	zum Teil
RIGS	<i>repeat induced gene silencing</i>	µg	Mikrogramm
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>	µl	Mikroliter
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	%	Prozent
RNAi	<i>RNA interference</i>		
RNase	Ribonuklease		
RNR	Ribonukleotid-Reduktase		
RNR1	große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase		
RNR2	kleine Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase		
RNR3	zweite große Untereinheit der RNR in <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
RR	Ribonukleotid-Reduktase		
rRNA	ribosomale RNA		
RSC	<i>remodels the structure of chromatin</i>		
RT	<i>Reverse Transkription</i>		
SDS	<i>suppressor of defective silencing</i>		
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>		
SIL1	<i>modifiers of silencing 1</i>		
siRNA	<i>small interfering RNA</i>		
SMARCA	<i>SWI/SNF2-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A</i>		
SNF2H	<i>SUCROSE NON-FRMENTING2-homolog</i>		
SNF2L	<i>SUCROSE NON-FRMENTING2-like</i>		
S-Phase	Synthese-Phase		
SRS	Silver-Russel-Syndrom		
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>		
SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>		
SUP	SUPERMAN		
SU(VAR)	<i>suppressor of variegation</i>		
SUVH	<i>SU(VAR)3-9 homolog</i>		
SWI2/SNF2	<i>SWITCH2/SUCROSE NON-FRMENTING2</i>		
T	Threonin		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
tair	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>		
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
T-DNA	Transfer-DNA		
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i>		
Thr	Threonin		
TIP5	<i>transcription termination factor 1 interacting protein 5</i>		
TM	<i>Trade Mark</i>		
TPE	<i>telomere position effect</i>		
TPEV	<i>telomere position effect variegation</i>		
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan		
U	<i>Units</i>		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
UV	ultraviolett		
V	Volt		
w/v	Masse je Volumen		
WT	Wildtyp		
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid		

1 Einleitung

1.1 Epigenetische Regulation – ein übergeordneter Schalter der Genexpression

Entwicklungsprozesse in Organismen gehen immer mit einer zeitlichen und räumlichen Genexpression einher. Dabei wird die Genaktivität von Transkriptionsfaktoren, DNA-Methyltransferasen und Chromatinmodifikatoren gemeinsam reguliert. Veränderungen im Expressionsverhalten können in Abhängigkeit von endogenen sowie exogenen Faktoren auftreten. So nehmen Ernährung und Umweltreize im erheblichen Maße Einfluß auf die Genaktivität.

Die Epigenetik beschäftigt sich mit solchen Veränderungen im Expressionsstatus. Der Begriff Epigenetik leitet sich von Epigenesis ab und wurde von Conrad Hal Waddington eingeführt (Waddington 1942). Demnach ist die Epigenetik eine Kombination aus den Disziplinen Genetik und Entwicklungsbiologie und beschäftigt sich mit den Einflußgrößen, durch die ein Genotyp im Phänotyp manifestiert wird. Diese epigenetischen Modifikationen sind stabile aber potenziell umkehrbare Veränderungen in der Genexpression, die ohne Änderungen der DNA-Sequenz vorkommen, aber die Chromatinanordnung beeinflussen. Auf diese Weise bestimmt die Chromatinstruktur die Genaktivität. Während Euchromatin transkriptionell aktiv ist, bleiben heterochromatische Regionen inaktiv. Permanent kondensiertes und inaktives konstitutives Heterochromatin ist auf die perizentrische Region, die *Nucleolus* organisierende Region (NOR) und die Telomere beschränkt (Fischer *et al.* 2006). Fakultatives Heterochromatin hingegen entsteht durch Heterochromatisierung euchromatischer Regionen und stellt somit einen epigenetischen Mechanismus zur permanenten Geninaktivierung während der Entwicklung dar (Fischer *et al.* 2006). Damit bilden epigenetische Modifikationen einen zweiten bzw. übergeordneten genetischen *Code* und können sowohl auf Tochterzellen als auch auf die nachfolgende Generation übertragen werden.

Eine gestörte epigenetische Regulation mit Auswirkung auf die Histonmodifikation [*epigenetic code* (Turner 2000) oder *histone code* (Strahl und Allis 2000, Jenuwein und Allis 2001)] sowie die DNA-Methylierung kann sich beim Menschen in Entwicklungsstörungen, Erbkrankheiten und Krebs manifestieren (Egger *et al.* 2004, Dean *et al.* 2005, Robertson 2005, Scarano *et al.* 2005). Erkrankungen wie das Silver-Russell-Syndrom (SRS), das Prader-Willi-Syndrom (PSW), der Wilms-Tumor und

Rhabdomyosarkome sind Auswirkungen eines gestörten epigenetischen Imprintings (Egger *et al.* 2004, Arnaud und Feil 2005, Dean *et al.* 2005, Robertson 2005, Scarano *et al.* 2005). Therapeutische Ansätze finden sich häufig in der Hemmung von DNA-Methyltransferasen sowie Histon-Deacetylasen (Egger *et al.* 2004, Wrzeska und Rejduch 2004, Lyko und Brown 2005, Scarano *et al.* 2005).

Ein Anwendungsfeld, in dem epigenetische Modifikationen von gravierender Tragweite sind, findet sich beim Klonen von Säugetieren. Erste Probleme wurden bereits beim Klonschaf Dolly deutlich und traten ebenfalls bei der Klonierung von Rindern, Ziegen, Schweinen und Mäusen in Erscheinung. Möglicherweise können die vorzeitig einsetzenden Alterungserscheinungen und ein früher Tod der Tiere am epigenetischen Profil des verwendeten somatischen Zellkerns liegen. Die Methode der Zellkernklonierung (*nuclear cloning*), bei der ein somatischer Zellkern einer adulten Zelle in eine entkernte Eizelle (Oocyte) übertragen wird, läßt bisher keinen Aufschluß über die genomische Reprogrammierung epigenetischer Modifikationen des adulten Donornukleus zu (Jaenisch *et al.* 2005, Wells 2005).

Bei Pflanzen spielen epigenetische Veränderungen eine wesentliche Rolle bei der Zelldeterminierung sowie der Blüteninduktion. So zeigen *Arabidopsis*-Pflanzen, die längere Zeit einer niedrigen Temperatur ausgesetzt wurden (Vernalisation), sowie Pflanzen, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden, DNA-Demethylierung und eine früher einsetzende Blüte als unbehandelte Pflanzen (Burn *et al.* 1993). Epigenetische Veränderungen dienen aber auch als Verteidigungsmechanismus gegen Viren und verhindern die Expression von transposablen Elementen und Retroviren (Vaucheret und Fagard 2001).

Gegenwärtig werden die Wechselwirkung zwischen DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Chromatinstruktur und RNA-Degradierung als molekulare Mechanismen epigenetischer Regulation diskutiert. Neben kodierenden RNA-Sequenzen nehmen bei diesen Prozessen auch nicht kodierende RNA-Sequenzen eine zentrale Rolle ein. Doppelsträngige RNAs (dsRNAs) (Beclin *et al.* 2002, Melquist und Bender 2003) werden dabei durch die dsRNA spezifische Ribonuklease III DICER in 21-25 Nukleotide große Fragmente abgebaut (Bernstein *et al.* 2001). Die so entstehenden *small interfering* RNAs (siRNAs) interagieren mit anderen Proteinen, wie den der ARGONAUTE-Familie (AGO-Familie), und bilden dadurch einen *RNA induced silencing complex* (RISC), der die Degradierung homologer mRNA bedingt (Zamore 2002, Tomari und Zamore 2005). DsRNAs und ihre abgeleiteten siRNAs

können ebenfalls Promotormethylierung einleiten, wenn sie Promotorsequenzen enthalten (Mette *et al.* 2000).

Diese Wechselwirkungen spiegeln sich in Phänomenen wie *transcriptional gene silencing* (TGS) und *posttranscriptional gene silencing* (PTGS), genomischem Imprinting (Reik und Walter 2001, Scott und Spielman 2004, Delaval und Feil 2004), Vernalisation (Burn *et al.* 1993), X-Chromosom-Inaktivierung (Brockdorff 2002, Heard *et al.* 2001) sowie in Paramutationen (Chandler und Vaucheret 2001, Chandler und Stam 2004) wieder und sind an der Erhaltung der Genomintegrität beteiligt. Dabei werden die epigenetischen Phänomene Imprinting, X-Chromosom-Inaktivierung und Paramutationen durch TGS verursacht.

Imprinting ist ein Phänomen der Inaktivierung, wodurch lediglich eines der beiden parentalen Allele eines Genes zur Expression gelangt. Bei *Arabidopsis thaliana* sind nur wenige dieser Phänomene beschrieben worden. Zwei Beispiele für Imprinting in *Arabidopsis*, bei dem das paternale Allel inaktiv bleibt, während das maternale Allel aktiviert wird, bilden der *MEDEA-* (*MEA-*) sowie der *FWA-Locus* (Autran *et al.* 2005, Berger 2004). In beiden Fällen unterliegt das maternale Allel dem gleichen regulatorischen Mechanismus (Autran *et al.* 2005, Berger 2004). Sowohl das maternale *MEDEA*, wie auch das maternale *FWA*-Allel werden durch die DNA-Glycosylase DEMETER, einen MET1-Antagonisten, in der 5' Region demethyliert und dadurch aktiviert (Autran *et al.* 2005, Berger 2004).

Darüber hinaus spielen TGS und PTGS eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung transgener Pflanzen und finden ihre Anwendung auch in der Aufklärung von Genfunktionen. Transgene Pflanzen wurden bereits Anfang der 80er Jahre des 20. Jh. von vier unabhängigen Arbeitsgruppen durch Übertragung bakterieller sowie pflanzlicher Gene erzeugt (Framond *et al.* 1983, Schell *et al.* 1983, Herrera-Estrella *et al.* 1983, Bevan *et al.* 1983, Fraley *et al.* 1983a, Fraley *et al.* 1983b, Murai *et al.* 1983). Seit dem Ende der 80er Jahre des 20. Jh. wurde bei Pflanzen zunehmend die Inaktivierung multipler Kopien inserierter Gene sowie die Inaktivierung endogener Genen mit Sequenzhomologie zur neu inserierten DNA beobachtet (Flavell 1994). Bereits 1989 konnten Matzke *et al.* (1989) an doppeltransformierten transgenen Tabakpflanzen TGS der Reportergene beobachten. Bei *Petunia*-Pflanzen wurde ebenfalls festgestellt, daß eine zusätzliche Kopie der Chalconsynthase oder der Dihydroxyflavonol-4-Reduktase häufig zum *silencing* der eingebrachten oder homologen endogenen Gene führt (Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990, Jorgensen 1990). Für diese Art der Inaktivierung wurde der Begriff „*cosuppression*“

eingeführt (Napoli *et al.* 1990, Jorgensen 1990). Auch bei transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen konnte beobachtet werden, daß der Phänotyp häufig nicht mit dem Genotyp im Einklang steht (Mittelsten Scheid *et al.* 1991). Die Hälfte der transgenen, hygromycinresistenten Pflanzen mit einer mehrfach integrierten Kopie der Fremd-DNA konnte dabei die Resistenz nicht an die nächste Generation übertragen (Mittelsten Scheid *et al.* 1991).

Beim epigenetischen *silencing* wird zwischen PTGS und TGS unterschieden. Dabei spielt DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle. Während es beim PTGS zur Methylierung der kodierenden Gensequenz und zur Degradierung der mRNA kommt, findet bei TGS eine Promotormethylierung statt, so daß die Genexpression erst gar nicht initiiert wird (Fagard und Vaucheret 2000, Morel *et al.* 2000, Sijen *et al.* 2001). Transgeninsertionen, die aufgrund ihrer Position, Struktur oder Redundanz Transposons ähneln werden mittels TGS inaktiviert (Vaucheret und Fagard 2001). Im Gegensatz dazu werden Transgengtranskripte, die viraler RNA ähneln, über PTGS abgebaut (Vaucheret und Fagard 2001). Trotz der unterschiedlichen regulatorischen Angriffspunkte sind die beteiligten molekularen Komponenten nahezu identisch (Vaucheret und Fagard 2001). Die Unterschiede liegen also im Auslösemechanismus. TGS wird häufig durch homologe und repetitive Sequenzen ausgelöst und dient in erster Linie der Abwehr mobiler Nukleinsäuren im Nukleus. Anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, daß mit abnehmender DNA-Methylierung die Transposonaktivität zunimmt (Singer *et al.* 2001, Miura *et al.* 2001). PTGS hat seinen Ursprung in der Abwehr invasiver Nukleinsäuren und ist im Zytoplasma angesiedelt. Dies spiegelt sich auch in der Vererbbarkeit dieser *silencing* Varianten wieder. Während TGS auf die nächste Generation stabil weitervererbt werden kann, muß PTGS stets neu ausgelöst werden.

Neben den funktionellen Unterschieden sorgen nomenklatorische Varianten für Verwirrung. So spricht man von PTGS bei Pflanzen, RNAi (*RNA interference*) bei Tieren und Quelling bei Pilzen. Auch für TGS sind Synonyme wie *homology dependent gene silencing* (HDS; Furner *et al.* 1998) und *repeat induced gene silencing* bekannt (RIGS; Assaad *et al.* 1993). Nach Furner *et al.* (1998) bezieht sich HDS jedoch auf eine transgenbedingte Inaktivierung homologer zellulärer Gene, während sich RIGS auf eine Transgeninaktivierung in Gegenwart von Sequenzwiederholungen bezieht (Assaad *et al.* 1993). Ye und Signer (1996) konnten zeigen, daß RIGS auf transkriptioneller Ebene durch Veränderung der Chromatinstruktur stattfindet.

Da beide Arten von *gene silencing* auch die Transgenexpression maßgeblich beeinträchtigen können (Vaucheret und Fagard 2001), ist es notwendig, die beteiligten molekularen Komponenten zu identifizieren und ihre Funktion zu verstehen. Bei Pflanzen werden dazu bevorzugt transgene Testsysteme mit einer mehrfach integrierten Kopie des Reportergens genutzt, die nach Mutagenese und Funktionsverlust *silencing* kontrollierender Gene zur Expression gelangen (Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Furner *et al.* 1998, Hofmann 2004). Mit solchen TGS-Suppressormutanten steht der Wissenschaft ein kraftvolles Werkzeug zur Verfügung, durch das die Identifizierung von *silencing* Komponenten erleichtert wird.

Ein ähnliches und sehr erfolgreich angewendetes Testsystem stellt die dominante Positioneffekt-Variation (PEV) des *white gene locus* in *Drosophila melanogaster* dar (Schultz 1936). Dabei wird durch Inversion ein chromosomales Rearrangement verursacht. PEV im eigentlichen Sinne entsteht, wenn ein euchromatisches Gen durch chromosomales Rearrangement in die Nähe zentromerischen Heterochromatins oder einer telomerischen Domäne platziert wird (Spofford 1976, Reuter und Spierer 1992, Tartof 1994, Weiler und Wakimoto 1995). In diesen Fällen kommt es in einigen Zellen zur Genexpression, während in anderen dieser *Locus* inaktiv ist, d. h. die mosaikartige Genexpression variiert. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* werden sehr ähnliche Phänomene in Form von *telomeric silencing* bzw. *telomeric position effect variegation* (TPEV) sowie *mating type silencing* beobachtet (Aparicio *et al.* 1991). Bei Pflanzen wurde PEV bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keiner eingehenden Untersuchung unterzogen. Bisher wurden nur zwei Studien über variiierende Genexpression nach Röntgenbestrahlung bei der Nachtkerze (*Oenothera lamarckiana*) veröffentlicht (Catcheside 1938, Catcheside 1949). Obwohl keine Nähe zum Heterochromatin nachgewiesen wurde, wurde angenommen, daß die beobachtete mosaikartige Expression des *P Locus* analog zur PEV bei *Drosophila* ist. Eine Schlußfolgerung dieser Studie war, daß die veränderte Expression in der Dislokation des Gens von seiner natürlichen Position begründet liegt. In einer einzigen weiteren Studie wurde in Pflanzen eine Beziehung zwischen instabiler Transgenexpression und parazentrischer Insertion berichtet (Iglesias *et al.* 1997).

Bei der epigenetischen Regulation in *Arabidopsis thaliana* nehmen die DNA-Methyltransferasen DRM1 (*domains rearranged methylase1*; Cao *et al.* 2000), DRM2 (*domains rearranged methylase2*; Cao *et al.* 2000), MET1 (METHYLTRANSFERASE1; Kankel *et al.* 2003) sowie CMT3 (CHROMOMETHYLASE3; Bartee *et al.* 2001), die Histon-Methyltransferasen SUVH2

(Naumann *et al.* 2005) und SUVH4 (KRYPTONITE; Jackson *et al.* 2002), sowie DDM1 (*decrease in DNA methylation*) aus der Familie der SWI2/SNF2-Chromatin-Remodelling-Helikasen/ATPasen (*SWITCH2/SUCROSE NON-FERMENTING2*; Jeddeloh *et al.* 1999) eine zentrale Rolle ein. Dabei scheinen die Gene *DRM1* und *DRM2* möglicherweise aus einer Genduplikation hervorgegangen zu sein (Cao und Jacobsen 2002). Dafür sprechen die sehr ähnlichen Sequenzen, sowie ihre physikalische Nähe von ca. einem cM (centi Morgan) zu einander (Cao und Jacobsen 2002). Die ersten beiden identifizierten Mutationen, die zu einer allgemeinen Cytosin-Hypomethylierung in *Arabidopsis* führten, waren *ddm1* und *ddm2* (Vongs *et al.* 1993). Während *DDM1* für einen Chromatin-Remodelling-Faktor aus der Familie der SWI2/SNF2-Helikasen/ATPasen kodiert (Jeddeloh *et al.* 1999), kodiert *DDM2* für eine DNA-Methyltransferase und wurde in *MET1* (*METHYLTRANSFERASE1*) umbenannt (Kankel *et al.* 2003). Auch die Proteine der ARGONAUTE-Familie, vor allem ARGONAUTE4, greifen in epigenetische Prozesse ein. ARGONAUTE4 wird vor allem im Zusammenhang mit PTGS, aber auch mit Histon- und DNA-Methylierung genannt (Zilberman *et al.* 2003). Veränderungen in den *Loci* dieser Proteine wirken sich allgemein oder lokal auf die DNA- oder Histon-Methylierung aus und können TGS sowie PTGS beeinträchtigen. Modifikationen in *MOM1* (*morpheus' molecule 1*), das eingeschränkte Homologie zur SWI2/SNF2-Familie besitzt, wirken sich zwar ebenfalls auf TGS aus, beeinträchtigen jedoch nicht die DNA- oder Histon-Methylierung (Amedeo *et al.* 2000, Mittelsten Scheid und Paszkowski 2000). Auch Mutationen in *HDA6* (Histon-Deacetylase 6; Probst *et al.* 2004) bzw. *SIL1* (*modifier of silencing*) beeinträchtigen zwar TGS, wirken sich jedoch nur geringfügig auf DNA-Methylierung aus (Furner *et al.* 1998, Mittelsten Scheid und Paszkowski 2000). PTGS kann ebenfalls in virusinfizierten Pflanzen beeinträchtigt werden, ohne daß dabei DNA-Methylierung beeinflusst wird (Jones *et al.* 1999). Aus diesem Grund wird davon abgesehen, DNA-Methylierung als Bindeglied zwischen den beiden Mechanismen der epigenetischen Geninaktivierung zu betrachten, obwohl DNA-Methylierung sowohl mit TGS als auch mit PTGS assoziiert ist (Vaucheret und Fagard 2001).

DNA-Methylierung könnte aber auch über MBD-Proteine (*methyl-CpG binding domain*) für die Geninaktivierung sorgen (Hendrich und Bird, 1998). Bei den MBD-Proteinen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die sich durch eine methylbindende Domäne auszeichnen (Hendrich und Bird, 1998). Nach Zemach *et al.* (2005) vermittelt in *Arabidopsis* DDM1 die Interaktion zwischen MBD-Proteinen und CpG-methylierten *Loci*, wodurch eine Demethylierung verhindert wird. Bei Säugern scheinen MBD-

Proteine ein Bindeglied zwischen DNA-Methylierung und Histon-Methylierung darzustellen (Fuks *et al.* 2003, Fujita *et al.* 2003). Darüber hinaus sind MBD-Proteine sowohl bei Tieren, als auch bei Pflanzen mit der Deacetylierung von Histonen verbunden (Hendrich und Tweedie 2003, Zemach und Grafi 2003). Die Vermutung liegt nahe, daß MBD-Proteine die Aktivität der Histon-Deacetylasen und Histon-Methyltransferasen beeinflussen und somit auch Einfluß auf die Heterochromatinisierung nehmen (Zemach *et al.* 2005).

DNA-Methylierung ist die am besten untersuchte Chromatinmodifikation. Sie wird meiotisch und mitotisch weiter vererbt (Johnson *et al.* 2002b) und kommt sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten vor. Arbeiten zur Nukleinsäure-Methylierung (RNA-Methylierung) gehen bereits auf das Jahr 1959 zurück (Scannell *et al.* 1959). Erste Arbeiten zur DNA-Methylierung wurden 1963 veröffentlicht (Friedman *et al.* 1963, Gold *et al.* 1963). Aus evolutionärer Sicht scheint DNA-Methylierung als Repressionsmechanismus in komplexeren Genomen entwickelt worden zu sein (Bird 1995) und dient der Kontrolle endogener Transposons (Yoder *et al.* 1997). Bei der DNA-Methylierung erfolgt eine kovalente Modifikation der Basen Adenin und Cytosin. Während Cytosin-Methylierung in Position 4 der exozyklischen Aminogruppe [C⁴-Methylcytosin (m⁴C)] ausschließlich bei Prokaryoten beobachtet wird, ist Adenin-Methylierung in Position 6 der exozyklischen Aminogruppe [N⁶-Methyladenin (m⁶A)] sowie Cytosin-Methylierung in Position 5 des Pyrimidinrings [C⁵-Methylcytosin (m⁵C)] in beiden Gruppen verbreitet (Hattman 2005). Im Gegensatz zu Prokaryoten spielt bei Eukaryoten DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Genaktivität und äußert sich in der Änderung der Chromatinstruktur. Cytosin-Methylierung in Position 5 des Pyrimidinrings ist bei Eukaryoten oft mit repetitiven Sequenzen einschließlich Transposons und ihren Derivaten verbunden (Selker 1999, Yoder *et al.* 1997). Dadurch werden die Transkription (Yoder *et al.* 1997, Bird 1995, Martienssen 1998) und Transposition (Yoder *et al.* 1997, Maloisel und Rossignol 1996) dieser *repeats* kontrolliert. Dagegen ist die Bedeutung der Adenin-Methylierung in Position 6 der exozyklischen Aminogruppe unbekannt (Hattman 2004).

Transcriptional gene silencing bei Eukaryoten steht im Zusammenhang mit der Ausbildung von Heterochromatin (Jackson *et al.* 2002). Das Heterochromatin der meisten Eukaryoten ist neben erhöhter DNA-Methylierung vor allem durch Methylierung der Lysinreste 9 und 27 am Histon H3 (H3K9- und H3K27-Methylierung) sowie Histon-Deacetylierung gekennzeichnet (Mathieu *et al.* 2003). Euchromatin hingegen weist sich durch Methylierung des Lysinrestes 4 am Histon H3 (H3K4-

Methylierung) sowie ein hohes Maß an Histon-Acetylierung aus (Mathieu *et al.* 2003). Doch im Gegensatz zum DNA-Code ist der *histon code* nicht universell, sondern variiert zwischen Tieren, Pflanzen und Pilzen (Loidl 2004). Dabei können Histon-Lysinreste mono-, di- und trimethyliert sein (Ebert *et al.* 2004). *Arabidopsis*-Heterochromatin zeichnet sich durch Histon H3K9-Mono- und Dimethylierung, Histon H3K27-Mono- und Dimethylierung sowie Histon H4K20-Monomethylierung aus (Naumann *et al.* 2005). Dagegen stehen Histon H3K9-Trimethylierung, Histon H3K27-Trimethylierung, Histon H4K20-Di- und Trimethylierung sowie Histon H3K4- und Histon H3K36-Methylierung für Euchromatin in *Arabidopsis* (Naumann *et al.* 2005).

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich meistens um symmetrische CpG- und CpNpG-Methylierung, aber auch asymmetrische Methylierung wird beobachtet (Johnson *et al.* 2002b). Während im Säuger-Genom hauptsächlich symmetrische Cytosin-Methylierung [5-CpG-3 (CpG)] stattfindet, kommt in Pflanzen- und Pilzgenomen sowohl CpG- als auch nicht-CpG-Methylierung (CpNpG- und CpNpN-Methylierung; N=A, C, T) vor (Yoder *et al.* 1997; Colot und Rossignol 1999; Finnegan und Kovac 2000, Johnson *et al.* 2002b). Bei Säugern findet DNA-Methylierung bevorzugt in genomischen Regionen mit einer überdurchschnittlich hohen Dichte an CpG-Dinukleotiden statt. Diese Regionen werden auch als so genannten CpG-Inseln bezeichnet. Pflanzen verfügen nicht über diese so genannten CpG-Inseln. Bei ihnen sind in erster Linie repetitiven DNA-Sequenzen im Heterochromatin methyliert. Aber auch Gene in der euchromatischen Region können bei *Arabidopsis* methyliert sein (Chan *et al.* 2005).

Bei den Methyltransferasen unterscheidet man zwischen *de novo* und *maintenance* Methyltransferasen. *De novo* Methyltransferasen übertragen Methylgruppen auf völlig unmethylierte DNA-Stränge, während *maintenance* Methyltransferasen Cytosine in der Nähe bereits methylierter Cytosine am komplementären DNA-Strang hemimethylierter DNA methylieren. Dabei dient S-Adenosyl Methionin (AdoMet) als Methylgruppendonor. Aufgrund von Strukturhomologien und konservierter Aminosäuremotive unterscheiden Colot und Rossignol (1999) fünf Gruppen von Methyltransferasen: DNMT1 (Bestor *et al.* 1988), PMT1/DNMT2 (Wilkinson *et al.* 1995), DNMT3 (Okano *et al.* 1998) CMT (Henikoff und Comai 1998) und MASC1 (Malagnac *et al.* 1997, Colot und Rossignol 1999). Das *Arabidopsis*-Genom enthält vier Methyltransferasen der DNMT1 Gruppe, je drei der CMT und DNMT3 Gruppe sowie ein Protein der DNMT2 Gruppe (<http://www.chromdb.org>, Finnegan und Kovac 2000, Kankel *et al.* 2003).

Die *Arabidopsis* Cytosin *de novo* Methyltransferasen DRM1 und DRM2 gehören zur DNMT3 Gruppe. Bei *drm1drm2*-Doppelmutanten ist TGS beeinträchtigt und die CpG-, die CpNpG- sowie die asymmetrische *de novo* Methylierung bleiben völlig aus (Cao *et al.* 2000, Cao und Jacobsen 2002a, Cao und Jacobsen 2002b, Cao *et al.* 2003).

MET1 ist eine Methyltransferase der DNMT1-Gruppe und methyliert Cytosine repetitiver sowie *single-copy* Sequenzen im gesamten *Arabidopsis*-Genom im CpG-Motiv (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996, Finnegan und Kovac 2000, Kankel *et al.* 2003). Indirekt beeinflusst MET1 über den Status der CpG-Methylierung auch die Methylierung des CpNpG-Motivs. MET1, wie auch die übrigen Mitglieder der DNMT1-Familie werden jedoch in erster Linie mit der Aufrechterhaltung der Methylierung in Verbindung gebracht. (Li *et al.* 1992, Pradhan *et al.* 1999, Finnegan und Kovac 2000, Kankel *et al.* 2003). Mutationen im *Arabidopsis* *MET1*-Gen verursachen einen genomweiten weitgehenden Verlust der Cytosin-Methylierung und eine Reihe phänotypischer Veränderungen sowie Entwicklungsstörungen (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996, Kakutani *et al.* 1996, Kankel *et al.* 2003, Saze *et al.* 2003, Aufsatz *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu sind in Mäusen Mutationen in *DNMT1*, dem *MET1*-homologen Gen bei Säugern, letal (Cao und Jacobsen 2002, Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996). Der Verlust der CpG-Methylierung in *met1*-Mutanten kann ebenfalls zum Verlust der Histon H3K9-Methylierung an *Loci* führen, die weiterhin inaktiv bleiben (Tariq *et al.* 2003).

Neben der Reaktivierung vormals inaktiver endogener und transgener Sequenzen wird in *Arabidopsis* TGS-Suppressormutanten und *antisense* Pflanzen auch eine mit der weitgehend genomweiten DNA-Hypomethylierung einhergehende Hypermethylierung und Geninaktivierung beobachtet. In *met1*- und *ddm1*-Mutanten sowie *antisense* *MET1*-Pflanzen (*asMET1*-Pflanzen) kann es trotz weitgehender genomweiter Hypomethylierung zu einer Hypermethylierung der *SUPERMAN*- sowie *AGAMOUS-Loci* (*SUP*- sowie *AG-Loci*) kommen (Jacobsen *et al.* 2000). Aufgrund der globalen Hypomethylierung erfahren diese an der Blütenentwicklung beteiligten *Loci* eine Veränderung in der Chromatinstruktur, die sie für DNA-Methylierung zugänglich macht. Dieses Phänomen ähnelt sehr stark der Hypermethylierung menschlicher Tumorsuppressorgene während des Anfangsstadiums von Krebs, wenn eine allgemeine genomweite Abnahme der Methylierung verzeichnet wird (Baylin *et al.* 2000).

CHROMOMETHYLASEN (CMTs) kommen dagegen ausschließlich in Pflanzen vor (Finnegan und Kovac 2000, Bartee *et al.* 2001, Lindroth *et al.* 2001). CMTs sind durch eine Chromodomäne zwischen den katalytischen Zentren I und IV der Cytosin-

Methyltransferasedomäne charakterisiert (Bartee *et al.* 2001). Es gibt drei *CMT*-Gene in *Arabidopsis thaliana*: *CMT1*, *CMT2*, und *CMT3* (Henikoff und Comai 1998; Finnegan und Kovac 2000; McCallum *et al.* 2000). *Arabidopsis*-*CMT3* (Lindroth *et al.* 2001) und die homologe Mais-*CMT* *ZMET2* (Papa *et al.* 2001) werden für die Aufrechterhaltung der CpNpG-Methylierung sowie der asymmetrischen Methylierung verantwortlich gemacht (Lindroth *et al.* 2001, Bartee *et al.* 2001). Malagnac *et al.* (2002) schreiben der *CHROMOMETHYLASE3* außerdem eine Mitverantwortung an der Initiierung und Ausbreitung der Methylierung zu. Dabei scheint es, daß *CMT3* bevorzugt transposonähnliche Sequenzen methyliert (Tompa *et al.* 2002). Da *CMT3* und *MET1* häufig gemeinsame Zielsequenzen aufweisen, scheint es, als ob sich CpG- und nicht-CpG-Methylierung redundant bezüglich der Transposonregulation verhalten. Auch zwischen *CMT3* und den *DRM* Methyltransferasen scheint eine gewisse Redundanz sowie Lokusspezifität bezüglich der Kontrolle asymmetrischer sowie CpNpG- Methylierung zu bestehen (Lindroth *et al.* 2001, Cao und Jacobsen 2002a, Cao und Jacobsen 2002b).

Doch welches Signal DNA-Methylierung initiiert und wie Methyltransferasen zu ihren Bestimmungsort geleitet werden, ist bisher noch nicht geklärt. Doppelsträngige RNA (dsRNA) oder abgeleitete kleine siRNAs initialisieren möglicherweise die DNA-Methylierung (Mette *et al.* 2000, Melquist und Bender 2003, Bender 2004). Das RNA-Signal lenkt Chromatin-Remodelling-Faktoren und histonmodifizierende Enzyme zu ihren genomischen Bestimmungsort, wo sie das Chromatin so modifizieren, daß Methylierung begünstigt wird.

DDM1 ist eines der regulatorischen Mechanismen, die der Chromatinstruktur eine übergeordnete Dynamik verleihen, indem sie kovalente Veränderungen an DNA und Histonen vornehmen und somit Einfluß auf die Genaktivität nehmen (Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Es wurde von Jeddelloh *et al.* (1999) identifiziert und gehört zu der Familie der *SWI2/SNF2*-Proteine (*SWITCH2/SUCROSE NON-FERMENTING 2*), die als DNA-abhängige ATPasen an der transkriptionellen Koaktivierung und Korepression der Chromatinanordnung sowie der DNA-Reparatur beteiligt sind (Jeddelloh *et al.* 1999, Verbsky und Richards 2001). *DDM1* fungiert als Chromatin-Remodelling-Faktor, indem es an das Nukleosom bindet und seine Umpositionierung induziert, also die Chromatinstruktur verändert und somit den Zugang der *METHYLTRANSFERASE1* (*MET1*) erleichtert (Jeddelloh *et al.*, 1999, Brzeski und Jerzmanowski 2003). Dabei wird die ATPase Aktivität ausschließlich von DNA, vor allem nukleosomaler DNA, stimuliert (Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Wie bei

anderen SWI2/SNF2-Proteinen wäre auch hier ein assoziiertes Protein, das die ATPase Aktivität steigert und als Kopplungsfaktor agiert, möglich (Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Auf diese Weise ist DDM1 für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung erforderlich (Vongs *et al.* 1993, Jeddelloh *et al.* 1999 Gendrel *et al.* 2002), ohne selbst durch DNA-Methylierung beeinflusst zu werden (Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Dabei scheinen assoziierte Proteine für die Registrierung des Methylierungsstatus verantwortlich zu sein (Brzeski und Jerzmanowski 2003). Aber im Gegensatz zu der Methyltransferase MET1 ist DDM1 noch nicht im haploiden Stadium des Gametophytengenoms aktiv (Vongs *et al.* 1993, Kakutani *et al.* 1999, Kankel *et al.* 2003, Brzeski und Jerzmanowski 2004). Möglicherweise spielt DDM1 in meristematischen Geweben eine Rolle bei der Replikation von DNA-Methylierung und ist in ausdifferenzierten Zellen an der Aufrechterhaltung des kondensierten Zustandes beteiligt (Brzeski und Jerzmanowski 2004). DDM1 ist ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Histon H3K9-Methylierung notwendig (Gendrel *et al.* 2002, Zemach *et al.* 2005). Im Heterochromatin von Wildtyp *Arabidopsis*-Pflanzen sind Transposons und inaktive Gene mit Histon H3K9-Dimethylierung assoziiert, während aktive Gene in erster Linie mit Histon H3K4-Methylierung in Verbindung gebracht werden (Johnson *et al.* 2002b). In *ddm1*-Mutanten wird der Verlust der Histon H3K9-Methylierung durch Histon H3K4-Methylierung ersetzt (Gendrel *et al.* 2002). In verschiedenen Systemen konnte gezeigt werden, daß DNA-Methylierung von der Histon H3K9-Methylierung abhängt (Heard *et al.* 2001, Tamaru und Selker 2001, Jackson *et al.* 2002, Johnson *et al.* 2002b). In *Neurospora crassa* ist die H3K9-Methylierung für DNA-Methylierung erforderlich (Tamaru und Selker 2001), während in *Arabidopsis* H3K9-Methylierung zum Teil CpNpG- und asymmetrische Methylierung beeinflusst (Jackson *et al.* 2002). Anderen Beobachtungen zufolge übt die Histon H3K9-Methylierung keinen Einfluß auf die DNA-Methylierung aus (Soppe *et al.* 2002, Tariq *et al.* 2003).

Möglicherweise könnten auch DDM1, MET1 und die Histon-Deacetylase HDA6 Bestandteile eines Komplexes sein (Lippman *et al.* 2003). Es ist hinreichend bekannt, daß DNA-Methyltransferasen mit Histon-Deacetylasen und weiteren Proteinen Komplexe bilden (Robertson *et al.* 2000, Fuks *et al.* 2000). Auch KRYPTONITE (KYP) und ARGONAUTE (AGO) werden als Bestandteile eines putativen Komplex diskutiert (Lippman *et al.* 2003).

1.2 Gegenstand der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Analyse neuer TGS-Suppressormutanten in *Arabidopsis thaliana*. Dadurch sollten detailliertere Erkenntnisse über epigenetische Regulationsmechanismen der Genexpression ergänzt werden, die auch außerhalb des Modellorganismus *Arabidopsis* zum Erkenntnisgewinn beitragen könnten. Dazu wurde ein transgenes *Silencing*-Testsystem verwendet (Hofmann 2004), das auf der Insertion einer repetitiven Anordnung des *LUCIFERASE*-Reportergens beruht. Diese Insertion wird in transgenen Pflanzen transkriptionell inaktiviert und hypermethyliert. Nach EMS-Mutagenese kann es zur Aktivierung des Transgens kommen, sofern Gene betroffen wurden, die TGS kontrollieren. Die *LUCIFERASE*-Aktivität läßt sich anschließend mit einem computergesteuerten Restlichtkamarasystem in Form von Falschfarbenbildern visualisieren, sowie in ihrer Intensität quantifizieren. Dabei konnten im Rahmen dieser Arbeit 9 TGS-Suppressormutanten charakterisiert werden. 7 enthielten Mutationen in den bereits bekannten TGS kontrollierenden Genen *DDMI*, *MET1* und *CMT3*. Dabei konnten zum ersten Mal eine dominant negative *ddm1*-Mutante und eine *met1*-Mutante, die die Fähigkeit zur CpG-Methylierung nicht vollständig verloren hat, beschrieben werden. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in *Arabidopsis thaliana* die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR1, R1) mit TGS in Verbindung gebracht. Schließlich konnte ein neuer, bisher unbekannter *Locus* auf Chromosom 5 in der perizentrischen Region zwischen 10180644 bp und 13222572 bp eingegrenzt werden, der offensichtlich ebenfalls TGS kontrolliert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) aus der Familie der *Bassicaceae* (Kohlgewächse) bringt ideale Voraussetzungen mit sich, um als botanisches Pendant zu *Drosophila melanogaster* Anwendung zu finden. Durch ihr kleines Genom (ca. 125 Mb auf 5 Chromosomen kodieren für ca. 25.000 Proteine), abgeschlossene Sequenzierung, den geringen Anteil an repetitiven Sequenzen, sowie die kurze Generationsfolge ist sie als Modellpflanze besonders gut geeignet. *Arabidopsis thaliana* wird deshalb allgemein für physiologische, molekulare und genetische Untersuchungen verwendet.

Das Ausgangspflanzenmaterial für diese Arbeit wurde von Dr. Ingo Hofmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, 06120 Halle) bereitgestellt (Hofmann 2004). Es handelt sich um *Arabidopsis thaliana* TGS-Suppressormutanten, die auf *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien vom Ökotyp *Columbia* zurückgehen. Diese T-DNA-Insertionen stellen ein neues Testsystem für *transcriptional gene silencing* (TGS) dar. Sie bestehen aus einer T-DNA mit 4 *LUCIFERASE*-Expressionskassetten in gleicher Orientierung. Dadurch wird eine Inaktivierung der Transgenexpression verursacht. Nach EMS-Mutagenese ermöglicht die *LUCIFERASE*-Aktivität eine gezielte Selektion von TGS-Suppressormutanten. Mit Hilfe eines CCD-Kamerasystems (Restlichtkamerasystems) läßt sich die Enzymaktivität erfassen und visualisieren.

Um die Mutationsorte zu kartieren wurden die *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien vom Ökotyp *Columbia* mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* gekreuzt. Dabei diente die Mutante immer als männlicher Kreuzungspartner. In dieser Arbeit wurden 9 Kartierungspopulationen aufgebaut und kartiert. Diese basieren auf F₂-Populationen, die aus den Mutanten der transgenen Linien 6, 7, 9 und 12 hervorgegangen sind. Die interne Bezeichnung für jede Mutantenlinie setzt sich aus 3 Zahlen zusammen, die jeweils durch einen Querstrich getrennt werden. Die erste Zahl steht für die Ausgangslinie, die zweite für den Pool innerhalb der Ausgangslinie und die dritte für die Mutante innerhalb des Pools. Nach

der Identifizierung des Mutationsortes wurde für die Mutanten die Allelbezeichnung verwendet. Die Mutantennomenklatur und Mutantencharakteristika sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Charakteristika des in dieser Arbeit verwendeten Mutantenmaterials.

Interne Nr.	Allelbezeichnung	Phänotyp	Veränderte DNA-Methylierung	LUCIFERASE-Aktivität
6/1/2	<i>ddm1-h2</i>	WT	CpG & CpNpG	sehr stark
7/2/7	<i>met1-h2</i>	schmale Blätter mit reduzierter Blattbehaarung, gesägte nach oben gerollte Blattränder, Ausbildung von Nebenblättern vor Blühbeginn, dicht beblätterte Infloreszenz, erhöhte Anzahl an Blütenorganen, frühe Blütenbildung, eingeschränkte Fertilität, frühe Blattseneszenz	CpG & CpNpG	sehr stark
7/2/11	<i>cmt3-h1</i>	große hellgrüne Blätter, schnelleres Wachstum, größerer Habitus, Kartierungspopulation entspricht WT	CpNpG	sehr stark
7/4/4	<i>met1-h1</i>	schmale Blätter mit reduzierter Blattbehaarung, gesägte nach oben gerollte Blattränder, Ausbildung von Nebenblättern vor Blühbeginn, dicht beblätterte Infloreszenz, erhöhte Anzahl an Blütenorganen, frühe Blütenbildung, eingeschränkte Fertilität	CpG & CpNpG	sehr stark
9/2/1	<i>ddm1-h1</i>	breitere und hellere Blätter, Kartierungspopulation entspricht WT	CpG & CpNpG	sehr stark
12/1/1	<i>met1-h3</i>	schmale Blätter mit reduzierter Blattbehaarung, gesägte nach oben gerollte Blattränder, Ausbildung von Nebenblättern vor Blühbeginn, dicht beblätterte Infloreszenz, erhöhte Anzahl an Blütenorganen, frühe Blütenbildung, eingeschränkte Fertilität	CpG & CpNpG	sehr stark
12/1/3	<i>rmr1-h1</i>	gelbgrüne Blätter mit weißer Panaschierung, stark gesägtem Blattrand und unregelmäßig ausgebuchteter Oberfläche, Blüteninduktion und Seneszenz setzen früher ein	keine Veränderung der DNA-Methylierung	stark
12/1/7		gelbgrüne Blätter mit dunkelgrünen Blattadern	keine Veränderung der DNA-Methylierung	mittelstark
12/2/7	<i>ddm1-h3</i>	breite, gewellte und in sich gedrehte Blätter, Verlust der Apikaldominanz, mehrere Blattrossetten, kurze Infloreszenzen, Kartierungspopulation entspricht WT	CpG & CpNpG	schwach

2.1.2 Medien für die Kultur von Pflanzen

Das *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial wurde auf einem Gemisch aus Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) und Vermiculite in 2-3 mm Körnung (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt) kultiviert.

2.1.3 Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide

Alle verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf), Biorad (München), DifcoLab (Detroit, USA), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Die organischen Lösungsmittel wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Bei den Radiochemikalien handelte es sich um Produkte der Firmen Hartmann Analytics (Braunschweig) und ICN Pharmaceuticals (Irvine, USA). Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Appligene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega Corporation (Madison, USA), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) geliefert. Das Molekulargewicht der PCR- und Restriktionsreaktionen wurden mit Hilfe von Produkten der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bestimmt. Die Antibiotika stammten von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande) und Sigma (Taufkirchen). Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit Produkten der Firmen Macherey Nagel (Düren) und Qiagen (Hilden). Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert und sind im Anhang (7.1) aufgelistet. Schließlich wurden die Sequenzreaktionen mit Produkten der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt.

2.1.4 Vektoren

Für die Klonierung von PCR-Produkten und durch Restriktion erzeugten DNA-Fragmenten wurde der Vektor pGEM[®]-T der Firma Promega (Madison, USA)

verwendet. Zur agrobakterienvermittelten Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der binäre Vektor pCB302 (Xiang *et al.* 1999) verwendet. Der BAC-Klon F7D8 wurde beim ABRC DNA stock centre (Columbus, USA) geordert.

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme

Die Klonierung von DNA und PCR-Produkten wurden mit dem *Escherichia coli* Stamm *DH5 α* der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) durchgeführt. Für die Komplementation der Mutante *rnr1-h1* (interne Bezeichnung: 12/1/3) wurde *Agrobacterium tumefaciens* *GV3101 pMP 90* verwendet (Koncz und Schell 1986).

2.1.6 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Die Vermehrung von Bakterien erfolgte im LB-Medium, das mit *LB-Broth High Salt* der Firma Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) nach Angaben des Herstellers zubereitet wurde. Die Plasmidselektion wurde auf festem Medium durchgeführt, das mit *LB-Agar High Salt* der Firma Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) nach Angaben des Herstellers angesetzt wurde. Für die Plasmidselektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) der Firma AppliChem (Darmstadt) verwendet. Um das *lacZ α* -System nutzen zu können wurde dem Medium 20mg/ml X-Gal der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) zugesetzt.

Das Medium für die Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* *GV3101 pMP 90* wurde aus Produkten der Firma DifcoLab (Detroit, USA) nach Angaben des Herstellers erzeugt. Für die Selektion wurden die Antibiotika Gentamycin (10 mg/l) und Rifampicin (100 mg/l) der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion genomischer Pflanzen-DNA

Die Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA erfolgte nach der Methode von Brandstädter *et al.* (1994). Dazu wurden 3 - 5 Blätter in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Blätter mit einem vorgekühlten Glasstab homogenisiert und in 1 ml DNA-Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) suspendiert. Dann wurde die Suspension 10 min bei 65°C inkubiert und mit 300 μ l essigsaurer Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) aufgefüllt. Das Lysat wurde 10 min im Eisbad inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 20000 x g, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) aufgefüllt. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (6 min, 6000 x g, 4°C) und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäure wurde mit 500 μ l Isopropanol gefällt (10 min bei -20°C) und durch Zentrifugation (15 min, 20000 x g, 4°C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 700 μ l eisgekühlten 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 20000 x g, 4°C) und ca. 1 h bei 37°C getrocknet. Zuletzt wurde das DNA-Pellet in 100 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (mit 100 μ g/ml RNase A) aufgenommen und bis zur weiteren Verwertung bei 4°C gelagert.

2.2.2 Gelelution

Zur Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Banden auf dem UV-Transilluminator mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und zum Abwiegen sowie zur weiteren Bearbeitung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Gelelution erfolgte hier mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden), dem QIAquick[®] Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden, D) sowie dem Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel), immer nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA 1 h bei 37°C getrocknet und in 100 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (mit 100 μ g/ml RNase A) aufgenommen.

2.2.3 RNA Extraktion

Die Präparation von Gesamt-RNA wurde nach der Trizol[®]-Methode durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde, wie in 2.2.1 beschrieben, Blattpulver erzeugt, in 1 ml Trizol suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 240 µl Chloroform wurde die Suspension gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (10 min, 6000 x g). Die obere Phase wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 20000 x g) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.4 Plasmidpräparation (Minipräp)

Die Präparation von Plasmiden aus LB-Kulturen wurde mit der *Boiling Lysis* Methode nach Holmes und Quigley (1981) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl eiskalter STET-Lösung [50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 8 % (w/v) Saccharose; 5 % Triton X 100] und 20 µl Lysozym-Lösung (20 mg/ml) resuspendiert. Danach wurde die Suspension 5 min auf Eis inkubiert, anschließend in einem Heizblock erhitzt (2 min, 100°C) und 5 min auf Eis gekühlt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 20000 x g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g) sedimentiert. Zuletzt wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (mit 100 µg/ml RNase A) gelöst.

2.2.5 Reinigung der Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit dem NucleoBond Plasmid-Purification-Kit der Firma Macherey Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 Isolation und Aufreinigung von BAC-DNA

Die Isolation von BAC-DNA (*Bacterial Artificial Chromosome DNA*) wurde mit dem NucleoBond Plasmid-Purification-Kit der Firma Macherey Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wird der Probe 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Danach wird die Probe gemischt und mit dem 3-fachen Volumen 100%igen Ethanol versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei -20°C oder 4 h bei -70°C inkubiert und anschließend 25 min zentrifugiert. Anschließend wird die Probe mit 70%igen Ethanol gewaschen und 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird bei 37°C getrocknet und in 30 µl Tris HCL aufgenommen.

2.2.9 In vitro Amplifikation durch PCR (*polymerase chain reaktion*)

Die Standard-PCR wurde in Anlehnung an Saiki *et al.* (1988) durchgeführt und den Erfordernissen entsprechen angepaßt.

2.2.10 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden zu 2 µg (entspricht 1 - 2 µl) RNA 2 µl (1 µg) Random-Primer pipettiert und mit Wasser (H₂O_{depc}) auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 70°C inkubiert und 5 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 8 µl dNTPs (10 mM), 1 µl (40 U) RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot), 5µl 5 x RT-Puffer und 1 µl (200 U) Reverse-Transkriptase (Promega, Madison, USA) hinzugefügt. Die Ansätze wurden schließlich 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion wurden die Proben 5 min bei 95°C inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung mit 18s- oder spezifischen Primern wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.2.11 Klonierung von PCR-Produkten

Die Amplifikation der DNA erfolgte hier mit der Pfu-Polymerase der Firma Promega (Madison, USA). Anschließend wurde ein überhängendes A an das 3'-Ende angehängt. Dazu wurde ein PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase der Firma Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) jedoch ohne Primer vorbereitet und 10 min bei 72°C inkubiert. Die so um ein überhängendes A erweiterten PCR-Fragmente wurden mittels Ligation in den pGEM-T Vektor der Firma Promega (Madison, USA) eingebaut. Nach der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α , Gibco BRL, Karlsruhe, D) und der Ausplattierung auf Amp-X-Gal-Platten wurden Klone selektiert, die Plasmide mit dem korrekten PCR-Fragment enthielten.

2.2.12 Kolonie-PCR

Um nachzuweisen, ob der Vektor das entsprechende Fremdgen trägt, wurden die Kolonien mittels PCR analysiert. Zu diesem Zweck wurden die zu analysierenden Kolonien mit einem Holzzahnstocher aufgenommen, auf einer neuen Amp-X-Gal-Agar-Platte ausgestrichen und anschließend in einem vorgelegten PCR-Master-Mix gelöst. Ergaben Koloniefärbung und PCR-Produkt keinen Widerspruch, so wurden die Kolonien für den Ansatz einer Übernachtskultur verwendet.

2.2.13 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in ethidiumbromidhaltigen 1%igen TAE- und 3%igen TBE-Agarosegelen. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 5 μ l 5 x Ladepuffer bei 20 μ l Probenvolumen bzw. 10 μ l 1 x Ladepuffer bei 2 μ l Probenvolumen versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 65 V und einer Laufzeit von ca. 3 h. Die Auswertung der Gele wurde schließlich mit Hilfe eines Transilluminators und digitaler Kamertechnik durchgeführt. Die Visualisierung der Nukleinsäuren ist durch die Lumineszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht möglich.

2.2.14 Charakterisierung des Methylierungsniveaus mittels *Southern*-Analyse

In dieser Arbeit wurden mittels *Southern*-Analyse spezifische Methylierungsmuster visualisiert. Dazu wurden die methylierungssensitiven Endonukleasen *HpaII* und *MspI* der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Restriktion der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden die Gele für 30 min in Denaturierungslösung (1 M NaOH; 1,5 M NaCl) und anschließend für 2 x 30 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl) geschwenkt. Danach wurde die DNA in einem Blot mit Filterpapierbrücke unter Ausnutzung der Kapillarkräfte mit 20 x SSC (0,3 M Natriumcitrat-Puffer pH 7,4; 3 M NaCl) aus dem Gel auf eine Membran der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) gesogen und im Stratalinker[®] UV Crosslinker (Stratagene, La Jolla, USA) durch UV-Bestrahlung (120 mJ) an die Membran fixiert. Die DNA-Sonde wurde mit dem Megaprime[™] DNA Labeling System (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Freie Nukleotide wurden mit ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Freiburg) abgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte im ExpressHyb[®]-Puffer (Clontech) nach Angaben des Herstellers. Die anschließende Analyse der radioaktiv markierten Membranen wurde am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale mit dem PhosphoImagers Storm II der Firma Molecular Dynamics (Krefeld) durchgeführt.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte als Service durch das institutseigene Sequenzierlabor unter Verwendung des ABI Prism[™] 377 DNA Sequencers und des ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaktion Kits, das entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt und von Frau Dipl.-Ing. Katrin Kittlaus (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, 06120 Halle) durchgeführt wurde. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor.

2.2.16 Markergestützte Kartierung putativer Mutationsorte

Die Kartierung der Mutationsorte wurde mit den PCR-basierten SSLP- (*simple sequence length polymorphism*) sowie CAPS-Markern (*cleaved amplified polymorphic sequence*) durchgeführt. Die Primer wurden mit Hilfe der Datenbanken *Arabidopsis thaliana* Genome Database (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/>) des *munich information center for protein sequences* (MIPS) (<http://mips.gsf.de>) und *The Arabidopsis Information Resource* (tair) (<http://www.arabidopsis.org/>) sowie dem Primer Design Programm Primer3 entwickelt. Die Synthese der Primer wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR- und Restriktionsprodukte erfolgte in 3%igen TBE-Gelen aus gleichen Teilen Agarose und *Low Melting*-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf). Die Längenpolymorphismen zwischen den Ökotypen wurden nach Auftrennung visualisiert. Eine Kopplung mit dem Mutationsort wurde bei einer Rekombinationsfrequenz unter 0,5 festgestellt. Eine Annäherung an den Mutationsort wurde von beiden Seiten so lange durchgeführt, bis nur noch der Längenpolymorphismus des *Columbia*-Hintergrundes amplifiziert wurde. Der so eingegrenzte Bereich wurde anschließend einer genauen Datenbankanalyse unterzogen.

2.2.17 LUCIFERASE-Test

Das neue Testsystem für *transcriptional gene silencing* (TGS) basiert auf *LUCIFERASE*-Reaktivierung in transgenen *Arabidopsis*-Mutanten (Hofmann 2004). Die *LUCIFERASE*-Expression wurde in TGS-Suppressormutanten nach Besprühen mit einer 50 μ M Luciferinlösung (Molecular Probes, Oregon, USA) visualisiert. Die emittierten Photonen wurden mit dem computergesteuerten Photon Counting System der Firma Hamamazu (Herrsching) erfaßt und als Falschfarbenbild mit weiß als hohe und dunkelblau als niedrige Photonendichte dargestellt.

2.2.18 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Bei *Arabidopsis thaliana* wie auch bei anderen Pflanzen aus Klimazonen mit saisonbedingten Temperaturunterschieden sind die Samen erst nach dem Durchlaufen

einer induktiven Temperatur bzw. Kälteperiode (Stratifikation) keimungsbereit. Um diese Kälteperiode zu simulieren wurden die Samen nach der Aussaat für 3 Tage im Kühlraum bei 4°C untergebracht. Die weitere Anzucht erfolgte unter Kurztagbedingungen in der Phytokammer (Fa. Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen-Frommern) bzw. im Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry USA). Um die Blüte zu induzieren wurden die Pflanzen in Langtagbedingungen überführt.

2.2.19 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zum Kreuzen der beiden Ökotypen wurde zunächst beim weiblichen Kreuzungspartner der Stempel einer ungeöffneten Blüte freipräpariert. Danach wurde mit den Staubgefäßen des männlichen Kreuzungspartners die Bestäubung vorgenommen. Dieser Vorgang wurde 3-mal im Abstand von 24 h wiederholt. Dabei diente die Mutante stets als männlicher Kreuzungspartner.

2.2.20 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden die kompetenten Zellen *Escherichia coli* DH5 α der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die kompetenten Zellen im Eisbad aufgetaut und je 50 μ l in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 5 μ l der Vektor-Insert-Lösung hinzugefügt und 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine 2-minütige Hitzeschockbehandlung bei 37°C. Nach Zugabe von 200 μ l LB-Medium wurden die Zellen 1 h auf einen Schüttelinkubator bei 37°C und 180 Upm kultiviert. Schließlich wurden die transformierten Zellen auf Amp-X-Gal-Agarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert, bevor sie für die Plasmidpräparation selektiert wurden.

2.2.21 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation mutagenisierter Pflanzen erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Dazu wurden kompetente Zellen hergestellt. 2 - 4 ml einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurden in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 10

mg/l Gentamycin und 100 mg/l Rifampicin überführt und 6 - 10 h auf einen Schüttelinkubator bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Danach wurden die Zellen im Eisbad abgekühlt und durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g) sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Zur Aufbewahrung wurden jeweils 200 µl kompetente Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen im Eisbad aufgetaut, mit 1 - 5 µg Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 5 min einem Hitzeschock von 37°C im Wasserbad unterzogen. Anschließend wurden 1 ml LB-Medium hinzugefügt und die Zellen für 2 - 4 h auf einen Schüttelinkubator bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Zuletzt wurden 100 µl des Ansatzes auf Selektionsplatten ausgestrichen und ca. 48 h bei 28°C inkubiert.

2.2.22 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde mit der *floral dip* Methode (Clough und Bent 1998) durchgeführt. Dafür wurden 500 ml LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Rifampicin und 10 mg/l Gentamycin mit einer 50 ml Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Danach wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (20 min, 4000 x g) und das Pellet in 100 ml einer 5 %igen Saccharose-Lösung mit 0,02 % Silwet L-77 aufgenommen. In diese Suspension wurden gerade blühende *Arabidopsis*-Pflanzen getaucht und für 24 Stunden dunkel gestellt. Anschließend wurden die Pflanzen bis zum Abreifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert.

Die T-DNA des binären Vektors pCB302 enthält das Basta-Resistenzgen *BAR*. Die mit diesem Vektor mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformierten Pflanzen lassen sich nach besprühen mit dem Herbizid Basta[®] (Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Sinsheim) selektieren. Dazu wurden die Pflanzen auf Erde kultiviert und im Keimblattstadium mit einer 1:5000 Verdünnung des Herbizids Basta[®] (Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Sinsheim) besprüht. Um eine zuverlässige Selektion zu gewährleisten wurde die Herbizidbehandlung mehrmals im Abstand von 3 Tagen wiederholt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Analyse neuer Suppressormutanten für TGS in *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Das verwendete transgene Mutantenmaterial wurde von Dr. I. Hofmann erzeugt (Hofmann 2004). Diese Pflanzen wurden mit einem neuen transgenen Testsystem für TGS mit *LUCIFERASE* als transgenen Reporter selektiert (Hofmann 2004). Das Testsystem basiert auf einer T-DNA-Insertion mit vier Kopien des Reportergens *LUCIFERASE* in gleicher Orientierung. Dadurch wird eine Expression des Transgens verhindert. Dagegen erfolgt in TGS-Suppressormutanten eine Transgenreaktivierung. Die *LUCIFERASE*-Reaktivierung läßt sich mit dem *Photon Counting System* der Firma Hamamazu (Herrsching) erfassen und als Falschfarbenbild visualisiert. Dabei werden Bereiche geringer Photonendichte dunkelblau dargestellt, während Bereiche starker Photonendichte weiß erscheinen. Da in den transgenen Linien 6, 7, 9 und 12 die *LUCIFERASE*-Inaktivierung besonders stabil erfolgte (Abb. 1) wurden diese Pflanzen als Ausgangslinien für die chemische Mutagenese sowie weitere Analysen ausgewählt (Hofmann 2004).

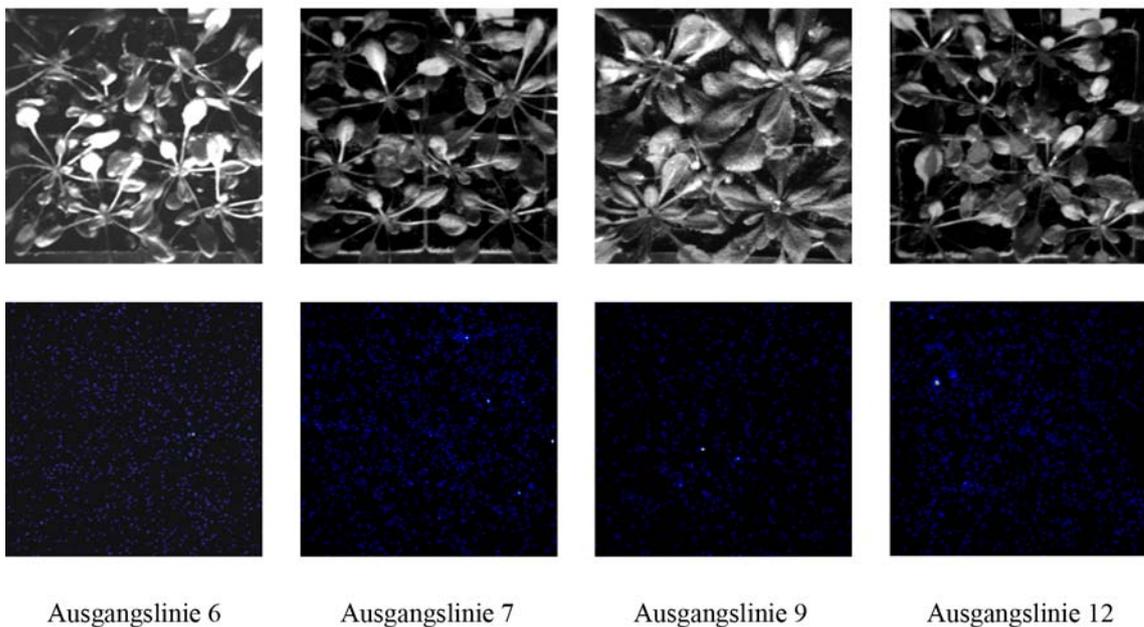


Abbildung 1: Falschfarbendarstellung der *LUCIFERASE*-Aktivität in den transgenen Ausgangslinien 6, 7, 9 und 12. Die Pflanzen der transgenen Linien 6, 7, 9 und 12 tragen ein T-DNA-Konstrukt mit 4 *LUCIFERASE*-Expressions-kassetten. Dadurch wird eine stabile Inaktivierung des Transgens verursacht. Im Falschfarbenbild wird die *LUCIFERASE*-Inaktivierung als geringe Photonendichte visualisiert und dunkelblau abgebildet.

Die hier analysierten Mutanten gehen auf Samen der M₃-Generation sowie Samen der F₁-Generation nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta*

zurück. Die bei Hofmann (2004) verwendeten Pflanzenbezeichnungen wurden in dieser Arbeit übernommen. Nach Identifikation des Mutationsortes wurde die Allelbezeichnung verwendet (Seite 14, Tabelle 1).

Für die Aufstellung der Kartierungspopulationen aus den F₂-Generationen waren *LUCIFERASE*-Reaktivierung und DNA-Hypomethylierung als Selektionskriterium ausschlaggebend. Die Mutanten 12/1/3 (*rnr1-h1*) und 12/1/7 zeigten keine Veränderung der DNA-Methylierung, aber eine Kosegregation des morphologischen Phänotyps und des TGS-Suppressorphänotyps (Transgenreaktivierung). Für diese beiden Mutanten konnte die Kartierungspopulation bereits im sehr frühen Entwicklungsstadium der F₂-Pflanzen selektiert werden.

Die Kartierung wurde mit SSLP-Markern (siehe Anhang 7.1.1), die auf Längenpolymorphismen zwischen den verwendeten Ökotypen *Columbia* und *Landsberg erecta* basieren und einem CAPS-Marker (siehe Anhang 7.1.2), der sich hinsichtlich der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoRI* zwischen beiden Ökotypen unterscheidet, durchgeführt. Diese Marker sind mit dem Mutationsort gekoppelt, wenn die Rekombinationsfrequenz weniger als 50 % beträgt. Die Rekombinationsfrequenz berechnet sich in Anlehnung nach Allard (1956) aus der Summe aller hinsichtlich des Markers rekombinanten Chromosomen dividiert durch die Anzahl aller Chromosomen die den Marker tragen. Die Eingrenzung des Mutationsortes erfolgte von zwei Seiten in Richtung abnehmender Rekombinationsfrequenz.

Die gute Verfügbarkeit von Sequenz- und Annotierungsdaten für *Arabidopsis thaliana*, sowie die Kenntnisse über bereits bekannte TGS-Modifikatoren ermöglichten sowohl eine enge Eingrenzung des Zielbereiches, als auch eine zielgerichtete Kartierung der Mutationsorte. Lediglich die Mutante 12/1/7 mit einer Mutation in der perizentrischen Region ließ aufgrund der geringen Rekombinationsfrequenz dieser Region und über 200 exprimierten Genen in dieser Region keine Lokalisation des Mutationsortes zu.

3.1 Identifizierung und Analyse neuer *met1*-Mutantenallele

Die Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* unterscheiden sich vom Wildtyp durch charakteristische pleiotrope Phänotypen, die bei den einzelnen Mutanten unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Abb. 2). Diese morphologischen Veränderungen äußern sich in einer veränderten Blattform und Blattgröße. Die Blätter dieser Mutanten sind sehr schmal mit stark gesägten sowie nach oben gerollten Blatträndern und weisen eine reduzierte Blattbehaarung auf.

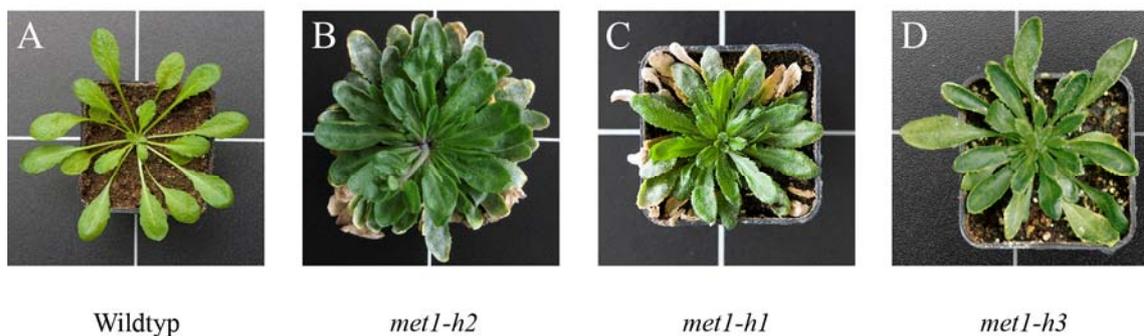


Abbildung 2: Morphologische Phänotypen der *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung zeigt Unterschiede in Blattform und Blattrosette der Mutanten *met1-h2* (B), *met1-h1* (C) und *met1-h3* (D) im Vergleich zum *Arabidopsis thaliana* Wildtyp *Columbia* (A). Die Mutanten (B - D) weisen eine charakteristische Schmalblättrigkeit mit stark gesägten, nach oben gerollten Blatträndern auf. Die Ausbildung der Nebenblätter der Blattrosette erfolgt bei diesen Mutanten bereits vor Blühbeginn (B).

Die Ausbildung der Nebenblätter der Blattrosette erfolgt bereits vor Blühbeginn. Die Infloreszenz weist eine dichte Beblätterung auf, der sich ein abnormaler Blütenphänotyp mit erhöhter Anzahl an Blütenorganen anschließt. Die Blüten sind oft mit bis zu 6 Blütenblättern und 8 Staubgefäßen ausgestattet. Auch die nahezu vollständige weibliche Sterilität ist für diesen Mutantentyp charakteristisch. Der Zeitpunkt der Blüteninduktion ist ebenfalls verändert. Auch das Wachstum erfolgt bei diesen Pflanzen langsamer als beim Wildtyp. Eine verfrüht einsetzende Blattseneszenz konnte dagegen nur bei der Mutantenlinie *met1-h2* beobachtet werden. Die Mutante *met1-h3* unterscheidet sich geringfügig von den Mutantenlinien *met1-h2* und *met1-h1*. Die morphologischen Phänotypen treten abgeschwächt in Erscheinung und auch die Fertilität ist etwas besser ausgeprägt.

Die Transgenreaktivierung ist bei allen drei Mutantenlinien sehr stark (Abb. 3). Sie konnte ebenfalls in der F₂-Generation nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* beobachtet werden und zeigte einen partiell dominanten Erbgang (Abb. 3). Auch der morphologische Phänotyp konnte in der F₂-Generation erneut

festgestellt werden und erwies sich ebenfalls als partiell dominant. Eine Kosegregation von Transgenreaktivierung und Phänotyp wurde nicht festgestellt.

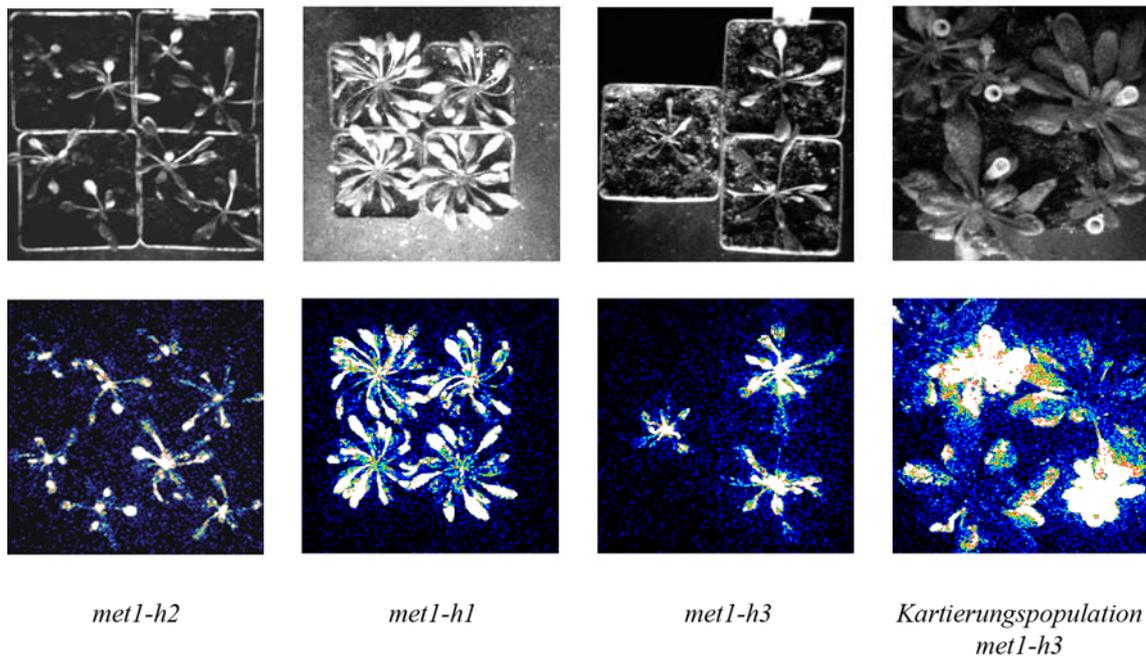


Abbildung 3: Transgenreaktivierung in den Mutanten *met1-h2*, *met1-h1*, *met1-h3* und der Kartierungspopulation *met1-h3*. Darstellung der *LUCIFERASE*-Reaktivierung durch Falschfarben in den Mutanten *met1-h2*, *met1-h1*, *met1-h3* und der Kartierungspopulation *met1-h3*. Die Transgenreaktivierung ist in allen drei Mutanten sehr stark. Mit dem transgenen Testsystem wurden jedoch in den Kartierungspopulationen (hier: *met1-h3*) wesentlich mehr als 25% der Pflanzen mit reaktivierter *LUCIFERASE*-Expression gefunden.

Mit der *Southern*-Analyse wurde bei allen drei Mutanten eine Hypomethylierung der Reportergene nachwiesen (Abb. 4). Durch den Einsatz der Restriktionsendonukleasen *HpaII* und *MspI* konnte eine Quantifizierung des Methylierungsniveaus vorgenommen werden. Beide Restriktionsenzyme verfügen über die Erkennungssequenz 5-CCGG-3. Ihre Aktivität wird jedoch vom Ausmaß der Cytosin-Methylierung bestimmt. *HpaII* schneidet, wenn keine Cytosin-Methylierung in der Erkennungssequenz vorliegt. Es kann keine Restriktion mehr durchführen, wenn eines der beiden Cytosin-Nukleotide, des inneren (CpG) oder des äußeren (CpNpG), methyliert ist. Dagegen schneidet *MspI* immer noch, wenn das innere Cytosin-Nukleotid methyliert ist. Es kann jedoch keine Restriktion durchführen, wenn das äußere Cytosin-Nukleotid methyliert ist (CpNpG). Aufgrund der Fragmentgrößen sowie dem Vergleich zwischen den Restriktionsmustern beider Enzyme konnte eine Aussage über die Cytosin-Methylierung getroffen werden. Der Verlust der Methylierung war bei diesen Mutanten unterschiedlich ausgeprägt. Bei der Mutante *met1-h2* war die Methylierung am stärksten reduziert. Beide Restriktionsenzyme erzeugten eher niedermolekulare Fragmente (Abb. 4). Die

Hypomethylierung der Cytosin-Nukleotide in den Reportergenen der Mutante *met1-h1* war nicht so stark wie bei der Mutante *met1-h2*. Beide Restriktionsenzyme erzeugten auch größere Fragmente als bei der Mutante *met1-h2* (Abb. 4). Dagegen wurde bei der Mutante *met1-h3* ein Unterschied in den beiden Fragmentmustern festgestellt (Abb. 4). Die CpG-Methylierung ist zwar vorhanden, aber deutlich weniger als in der Ausgangslinie.

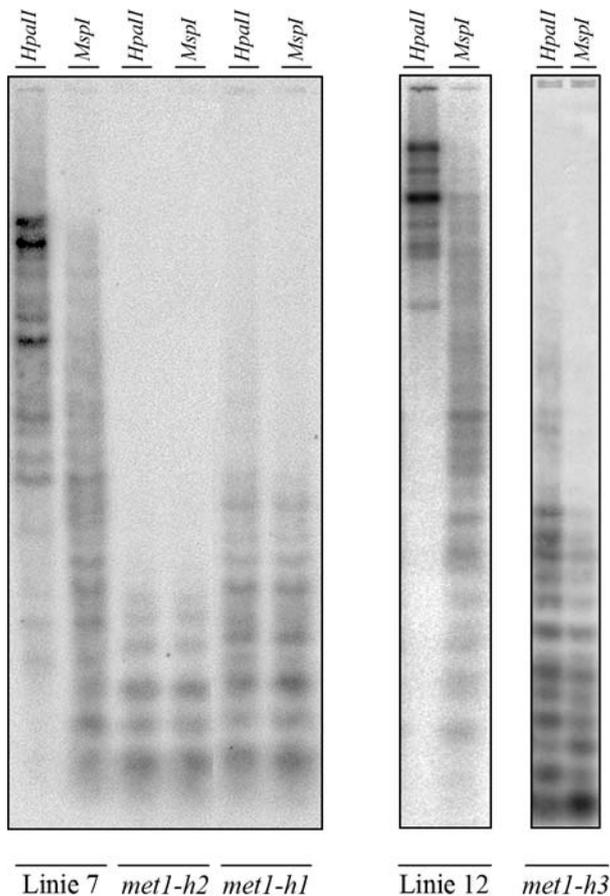


Abbildung 4: DNA-Methylierung bei den Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3*. Die Ergebnisse der Southern-Analysen für die Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* im Vergleich zu den Ausgangslinien 7 und 12. Dabei weisen die Mutanten einen z. T. dramatischen Verlust der DNA-Methylierung auf. Um die Unterschiede in der Cytosin-Methylierung zu visualisieren wurden die Proben mit den methylierungssensitiven Endonukleasen *HpaII* für das CpG-Motiv und *MspI* für das CpNpG-Motiv verdaut. Die Membranen wurden mit einer *LUCIFERASE*-Sonde hybridisiert.

Zum Aufbau der Kartierungspopulationen wurden zunächst alle Pflanzen mit starker Transgenreaktivierung selektiert (Abb. 3). Das Ausmaß der Hypomethylierung sowie der pleiotrope Phänotyp zeigten große Übereinstimmung mit bereits bekannten *met1*-Mutanten (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996). Deshalb wurde eine zielgerichtete Kartierung auf Chromosom 5 durchgeführt. Unter Verwendung des SSLP-Markers K20J1 wurde eine Kopplung mit dem Mutationsort bei 19919836 bp auf BAC K20J1 lokalisiert. Aufgrund seiner räumlichen Nähe erwies sich der *Locus* At5g49160 (*MET1-Locus*) als putatives Kandidatengen. Aber nicht alle Pflanzen der Kartierungspopulationen konnten eine Kopplung mit dem Mutationsort aufweisen. Möglicherweise wurden mit diesem Testsystem für *transcriptional gene silencing* auch hinsichtlich des Mutationsortes heterozygote Mutanten (*met1/MET1*) erfaßt (Abb. 3), da

kein eindeutig rezessiver Erbgang festgestellt wurde. Deshalb wurde eine Reselektion der Kartierungspopulationen mittels *Southern*-Analyse durchgeführt (Abb. 5). Zu diesem Zweck wurde lediglich eine Restriktion mit *HpaII* durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß Pflanzen, die eine Kopplung mit dem putativen Mutationsort aufwiesen, deutlich hypomethyliert waren. Bei den reselektierten Pflanzen wurde anschließend eine Sequenzierung des *MET1-Locus* (At5g49160) durchgeführt.

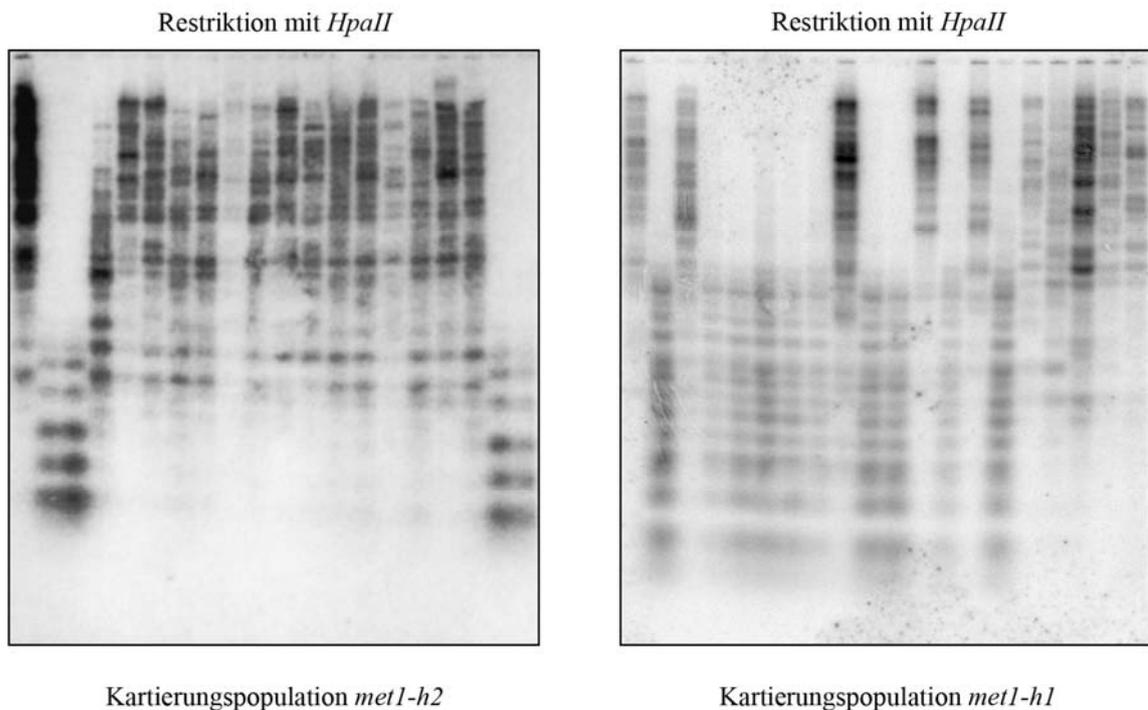


Abbildung 5: DNA-Methylierung in den Kartierungspopulationen der Mutanten *met1-h2* und *met1-h1*. *Southern*-Analysen der Kartierungspopulationen *met1-h2* und *met1-h1* unter Verwendung der Endonuklease *HpaII*. Die analysierten Pflanzen wurden aufgrund ihrer *LUCIFERASE*-Aktivität vorselektiert.

Die Sequenzanalyse des *Locus* At5g49160 (*MET1-Locus*) ergab für die Mutante *met1-h2* eine Punktmutation in Position 1994 der ungespleißten Nukleotidsequenz (Abb. 6). Dabei wurde Guanin (G) nach Adenin (A) mutiert. Daraus resultierte eine Veränderung der Aminosäuresequenz in Position 637 der METHYLTRANSFERASE1. Aus dem Codon TGG für Thryptophan (W, Trp) wurde das Stop-Codon TAG. Für die Mutante *met1-h1* konnte mit der Sequenzierung des *Locus* At5g49160 (*MET1-Locus*) eine Punktmutation in Position 4520 der ungespleißten Nukleotidsequenz von Guanin (G) nach Adenin (A) nachgewiesen werden (Abb. 6). Infolge dieser Punktmutation wurde in Position 1272 der Aminosäuresequenz aus dem Codon GAG für Glutaminsäure (Glu; E) das Codon AAG für Lysin (Lys; K). Auch in der Mutante *met1-h3* konnte eine Punktmutation im *Locus* At5g49160 (*MET1-Locus*) bestätigt werden. Dabei wurde in

Position 4596 der ungespleißten Nukleotidsequenz eine Mutation von Cytosin (C) nach Thymin (T) nachgewiesen (Abb. 6). Durch diese Punktmutation wurde in Position 1297 der Aminosäuresequenz ein Aminosäureaustausch verursacht. Dabei wurde aus dem Codon CCT für Prolin (Pro, P) das Codon CTT für Leucin (Leu, L).

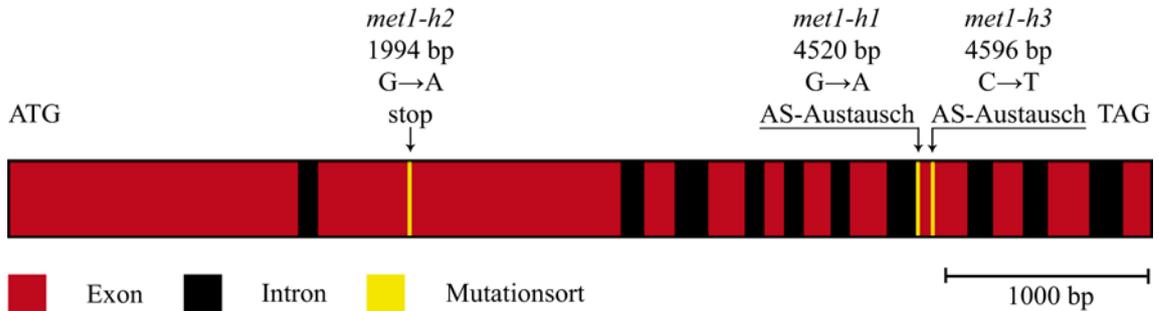


Abbildung 6: Exon/Intron-Struktur des *MET1*-Locus. Die Abbildung zeigt die Exon/Intron-Struktur von *MET1* sowie die Mutationsorte der Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3*. Die Exons sind als rote und die Introns als schwarze Boxen dargestellt. Die Mutationsorte werden von gelben Markierungen angezeigt. Die Nukleotidsubstitution bei der Mutante *met1-h2* läßt ein Stop-Codon entstehen, während die Substitutionen in den Mutanten *met1-h1* und *met1-h3* einen Aminosäureaustausch bewirken.

Die RT-PCR-Analyse wurde für alle drei *met1*-Mutanten mit den Primern Met1-2 im 5'-Bereich und Met1-4 im 3'-Bereich von *MET1* durchgeführt. Dabei wurde bei der Mutante *met1-h2* im Vergleich zum Wildtyp eine Verringerung der Transkriptmenge festgestellt (Abb. 7). Im Gegensatz zur Mutante *met1-h2* konnte mit der RT-PCR-Analyse bei den Mutanten *met1-h1* und *met1-h3* kein Unterschied in der Transkriptmenge festgestellt werden (Abb. 7). Sie weisen eine gleich starke Transkriptmenge wie der Wildtyp auf.

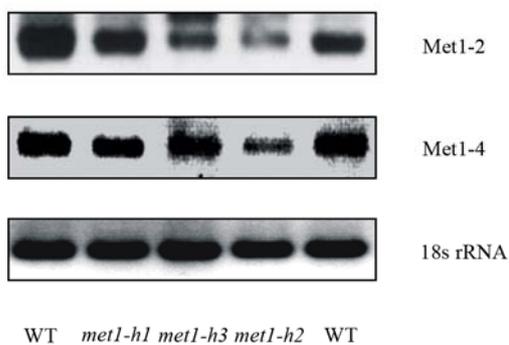


Abbildung 7: Semi-quantitative RT-PCR-Analysen der Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3*. Unter Verwendung der lokusspezifischen Primer Met1-2 und Met1-4 wurde bei allen drei Mutanten eine Transkriptakkumulation beobachtet. Lediglich die Mutante *met1-h2* zeigt im Vergleich zum Wildtyp (WT) eine verringerte Transkriptmenge. Die Kontrolle der verwendeten RNA-Mengen wurde mit Primern der 18S rDNA durchgeführt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Mutantanalyse

	<i>met1-h2</i>	<i>met1-h1</i>	<i>met1-h3</i>
Morphologischer Phänotyp	schmale Blätter mit reduzierter Blattbehaarung, gesägte nach oben gerollte Blattränder, Ausbildung von Nebenblättern vor Bühbeginn, dicht beblätterte Infloreszenz, erhöhte Anzahl an Blütenorganen, frühe Blütenbildung, eingeschränkte Fertilität, frühe Blattseneszenz nur bei <i>met1-h2</i>		
Erbgang des morphologischen Phänotyps und der Transgenreaktivierung	partiell dominant		
Transgenreaktivierung in den Ausgangsmutanten	sehr stark		
Transgenreaktivierung in der Kartierungspopulation	sehr stark		
DNA-Methylierung im CpG-Motiv	sehr stark reduziert	stark reduziert	reduziert
DNA-Methylierung im CpNpG-Motiv	sehr stark reduziert	stark reduziert	stark reduziert
Mutationsort	At5g49160 (<i>MET1</i>)		
gekoppelter Marker	K20J1 bei 19919836 bp		
Mutation in der Nukleotidsequenz	Punktmutation in Position 1994 G→A	Punktmutation in Position 4520 G→A	Punktmutation in Position 4596 C→T
Aminosäuresequenz	in Position 637 TGG→TAG Trp→STOP	in Position 1272 GAG→AAG Glu →Lys	in Position 1297 CCT→CTT Pro→Leu
RT-PCR	reduzierte Transkriptmenge	starkes Transkript	

3.2 Identifizierung und Analyse eines neuen *cmt3*-Mutantenallels

Die Mutante *cmt3-h1* unterscheidet sich vom Wildtyp durch einen schwachen morphologischen Phänotyp, der durch besonders große hellgrüne Blätter gekennzeichnet ist (Abb. 8 B). Neben den abweichenden morphologischen Phänotyp unterscheidet sich die Mutante *cmt3-h1* vom Wildtyp durch schnelleres Wachstum und einen insgesamt größeren Gesamthabitus (Hofmann 2004). Nach Kreuzung der Mutante mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* konnte in der F₂-Generation der Phänotyp nicht mehr beobachtet werden (Hofmann 2004).

Die *LUCIFERASE*-Reaktivierung wurde in der Mutante *cmt3-h1* als sehr stark eingestuft (Abb. 8 D). In der Kartierungspopulation wurde jedoch eine weniger intensive Reaktivierung des Reportergens gemessen (Hofmann 2004).

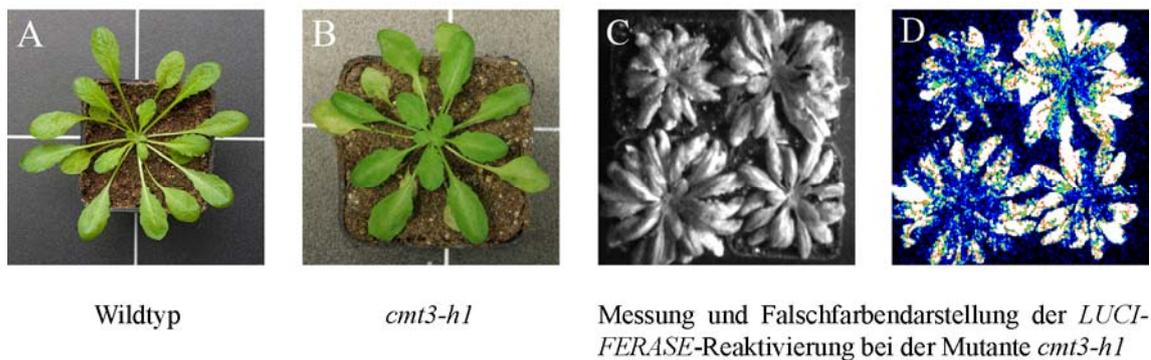


Abbildung 8: Morphologischer Phänotyp und *LUCIFERASE*-Aktivität bei der Mutante *cmt3-h1*. Die Mutante *cmt3-h1* (B) hat größere und hellere Blätter als der Wildtyp (A) und zeigt sehr starke Transgenreaktivierung (D).

Im Ergebnis der *Southern*-Analyse wurde festgestellt, daß lediglich nach einem Restriktionsverdau mit der Endonuklease *MspI* ausschließlich niedermolekulare Restriktionsfragmente entstehen. Im Vergleich zur transgenen Ausgangslinie 7 ist in der Mutante *cmt3-h1* die DNA-Methylierung am ersten Cytosin-Nukleotid der Erkennungssequenz 5-CCGG-3 (CpNpG-Motiv) deutlich reduziert (Abb. 9). Nach Kreuzung der Mutante *cmt3-h1* mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* wurde in der F₂-Generation die *LUCIFERASE*-Aktivität überprüft. Für den Aufbau der Kartierungspopulation wurden Pflanzen, die *LUCIFERASE*-Aktivität aufwiesen, einer *Southern*-Analyse unterzogen (Abb. 9). Dadurch konnten 19 Pflanzen mit einem TGS-Suppressorphänotyp in die Kartierungspopulation überführt werden. Die Kartierung des Mutationsortes führte zu einer Kopplung mit dem SSLP-Marker NGA 111 auf Chromosom 1. Dieses Ergebnis war ein erstes Indiz für eine *cmt3*-Mutante.

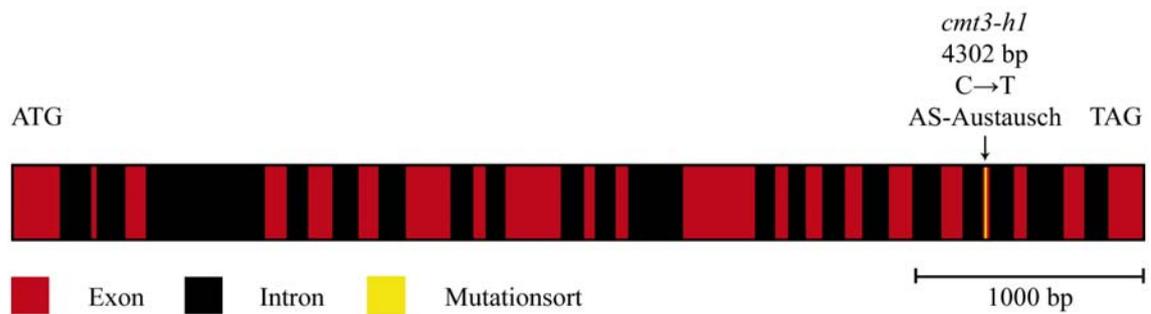


Abbildung 10: Exon/Intron-Struktur von *CMT3*. Die Abbildung zeigt die Exon/Intron-Struktur von *CMT3* sowie den Mutationsort in der *cmt3* Mutante *cmt3-h1*. Der Mutationsort wird von einer gelben Markierung angezeigt. Die Nukleotidsubstitution in der Mutante *cmt3-h1* verursacht einen Aminosäureaustausch in Position 715 der Proteinsequenz der CHROMOMETHYLASE3.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Mutantenanalyse

	<i>cmt3-h1</i>
Morphologischer Phänotyp der Mutantengeneration	besonders große hellgrüne Blätter, schnelleres Wachstum, insgesamt größerer Gesamthabitus
Morphologischer Phänotyp der Kartierungspopulation	kein Unterschied zum Wildtyp
Transgenreaktivierung in der Mutantengeneration	sehr stark
Transgenreaktivierung in der Kartierungspopulation	schwach
DNA-Methylierung im CpG-Motiv	unverändert
DNA-Methylierung im CpNpG-Motiv	drastisch reduziert
Mutationsort	At1g69770 (<i>CMT3</i>)
gekoppelter Marker	NGA 111 bei 27356874 bp
Mutation in der Nukleotidsequenz	Punktmutation in Position 4302 C→T
Mutation in der Aminosäuresequenz	Aminosäureaustausch in Position 715 CCC→CTC Pro→Leu

3.3 Identifizierung und Analyse neuer *ddm1*-Mutantenallele

Die im Folgenden analysierten Mutanten zeigten keinen einheitlichen morphologischen Phänotyp. Bei den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* wurde kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp festgestellt (Abb. 11). Die Mutante *ddm1-h3* unterscheidet sich vom Wildtyp durch breite, gewellte und in sich gedrehte Blätter (Abb. 11 D). Weitere Veränderungen im Habitus äußern sich durch den Verlust der Apikaldominanz, mehrere Blattrosetten und eine relativ kurze Infloreszenz. In der F₂-Generation nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* wurden keine morphologischen Abweichungen vom Wildtyp beobachtet.

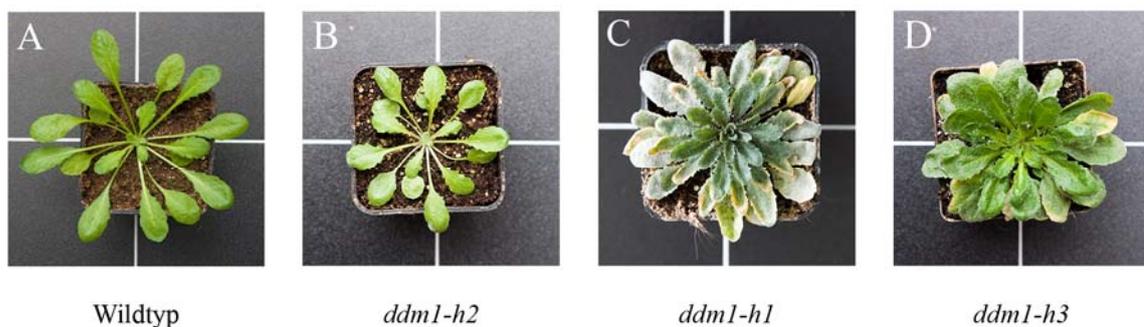


Abbildung 11: Morphologische Phänotypen der Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3* im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung zeigt morphologische Phänotypen der Mutanten *ddm1-h2* (B), *ddm1-h1* (C) und *ddm1-h3* (D) im Vergleich zum *Arabidopsis thaliana* Wildtyp *Columbia* (A). Die Mutanten weisen keinen gemeinsamen charakteristischen Phänotyp auf. Die Mutanten *ddm1-h2* (B) und *ddm1-h1* (C) unterscheiden sich nicht vom Wildtyp (A). Lediglich die Mutante *ddm1-h3* (D) weist einen charakteristischen Habitus auf. Die Blätter sind breiter, gewellt und in sich gedreht. In der F₂-Generation nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* konnten keine morphologischen Abweichungen vom Wildtyp (A) festgestellt werden.

Die Transgenreaktivierung war bei den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* sehr stark (Abb. 12). Bei der Mutante *ddm1-h3* konnte nur eine schwache Transgenreaktivierung festgestellt werden (Abb. 12). Nach Kreuzung der Mutanten mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg* konnte die Transgenreaktivierung in allen 3 F₂-Generation wieder beobachtet werden. Die starke Reaktivierung der Transgenexpression bildete das Kriterium für die Selektion von zwei der drei Kartierungspopulationen. Auf dieser Basis wurden 28 F₂-Pflanzen der Mutante *ddm1-h2* und 31 F₂-Pflanzen der Mutante *ddm1-h1* für die Kartierung ausgewählt. Bei den F₂-Hybriden der Mutante *ddm1-h3* wurde eine mittlere Aktivierung der Transgenexpression beobachtet. Die Transgenreaktivierung wurde bei diesen Pflanzen dominant vererbt. Aus diesem Grund basiert hier die Selektion der Kartierungspopulation auf den Ergebnissen der *Southern*-Analyse (Abb. 13).

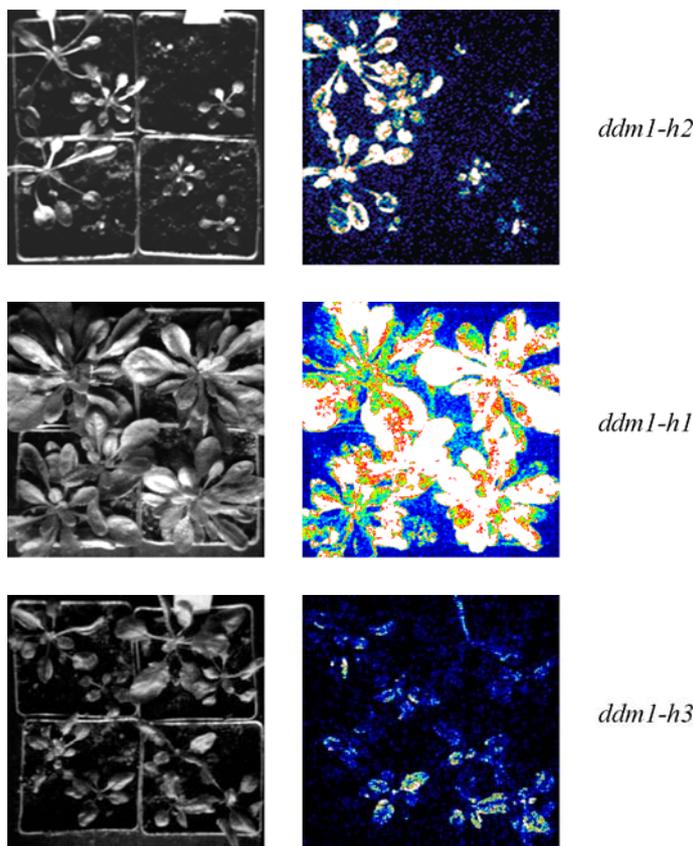


Abbildung 12: Transgenreaktivierung in den Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3*. Darstellung der *LUCIFERASE*-Reaktivierung durch Falschfarben in den Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3*. Die Transgenreaktivierung ist in den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* sehr stark. In der Mutante *ddm1-h3* ist die *LUCIFERASE*-Reaktivierung schwächer als in den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1*.

Mit der *Southern*-Analyse konnte bei allen drei Mutanten eine drastische Reduzierung der Cytosin-Methylierung nachgewiesen werden (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde für die Selektion der Kartierungspopulation aus den F₂-Hybriden der Mutante *ddm1-h3* nur die Endonuklease *HpaII* verwendet (Abb. 13). Dabei konnte festgestellt werden, daß die bezüglich des Mutationsortes homozygoten F₂-Pflanzen eine sehr starke Hypomethylierung sowie schwächere Transgenreaktivierung aufweisen, während die heterozygoten F₂-Hybriden deutlich remethyliert waren und sich durch eine stärkere Transgenreaktivierung unterscheiden.

In Folge der Kopplungsanalyse konnte in allen drei Kartierungspopulationen eine Kopplung des Mutationsortes auf Chromosom 5 mit den SSLP-Markern SNP K1F13 (auf BAC K1F13 bei 26543550 bp) und SNPMuD21 (auf BAC MuD21 bei 26714006 bp) festgestellt werden. Die räumliche Nähe beider gekoppelter SSLP-Marker zum *DDMI-Locus* (At5g66750) auf BAC MSN2 führte in allen drei Fällen zur Sequenzierung des *Locus* At5g66750. Mit der Sequenzanalyse konnte bei der Mutante *ddm1-h2* eine Punktmutation am Exon/Intron-Übergang in Position 2613 der ungespleißten Nukleotidsequenz des *DDMI-Locus* nachgewiesen werden (Abb. 14). Dabei wurde Guanin (g) durch Adenin (a) substituiert. Bei der Mutante *ddm1-h1* wurde in Position 2301 der ungespleißten Nukleotidsequenz des *DDMI-Locus* Cytosin (C) durch Thymin (T) ersetzt (Abb. 14). Dadurch wurde das Codon CAG für Glutamin (Q,

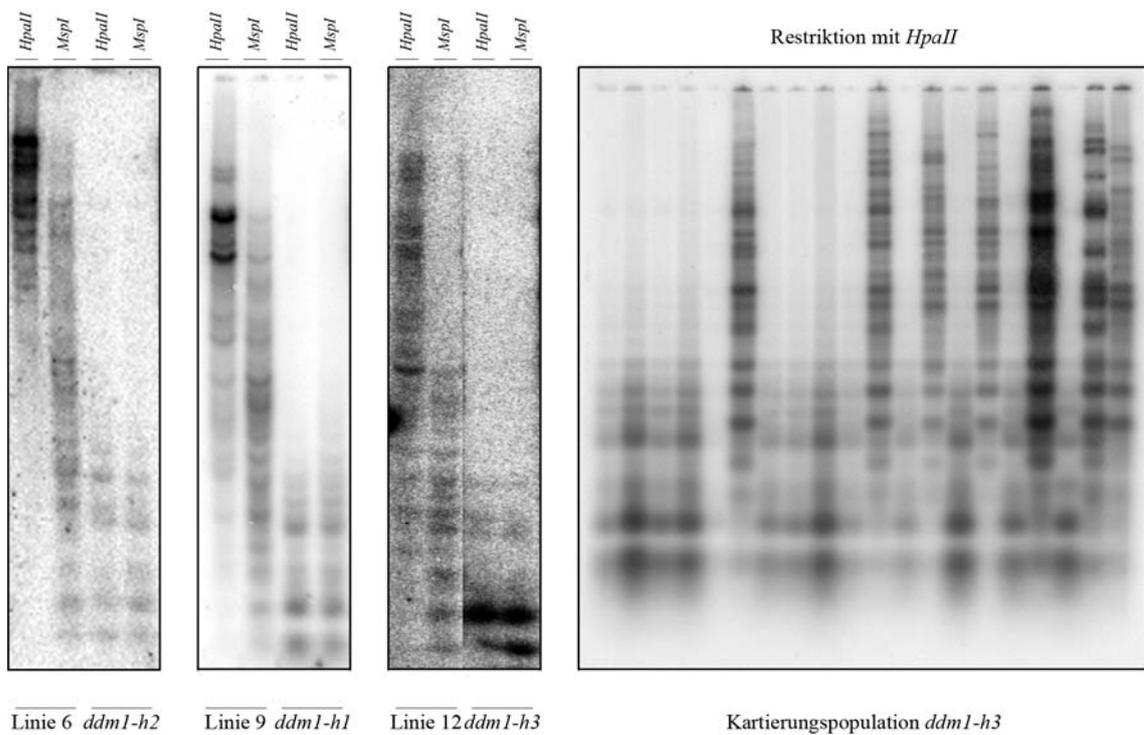


Abbildung 13: DNA-Methylierung bei den Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1*, *ddm1-h3* sowie der Kartierungspopulation *ddm1-h3*. Southern-Analysen der Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3* im Vergleich zu den Ausgangslinien 6, 9 und 12, sowie der Kartierungspopulation *ddm1-h3*. Alle drei Mutanten weisen einen typischen Verlust der DNA-Methylierung sowohl im CpG-Motiv, als auch im CpNpG-Motiv auf. Für die Selektion der Kartierungspopulation *ddm1-h3* war lediglich ein Verdau mit der methylierungssensitiven Endonuklease *HpaII* für das CpG-Motiv notwendig. Dadurch konnte eindeutig zwischen homozygoten Pflanzen (*met1/met1*) und heterozygoten Pflanzen (*met1/MET1*) in der F₂-Population der *ddm1-h3/Ler* Hybriden unterschieden werden. Homozygote Pflanzen zeigten eine dramatische Cytosin-Hypomethylierung im CpG-Motiv.

Gln) verändert und durch das Stop-Codon TAG ersetzt. Schließlich wurde bei der Mutante *ddm1-h3* eine Punktmutation am Exon/Intron-Übergang in Position 3126 der ungespleißten Nukleotidsequenz des *DDMI-Locus* verursacht (Abb. 14). Auch hier wurde Guanin (g) durch Adenin (a) substituiert.

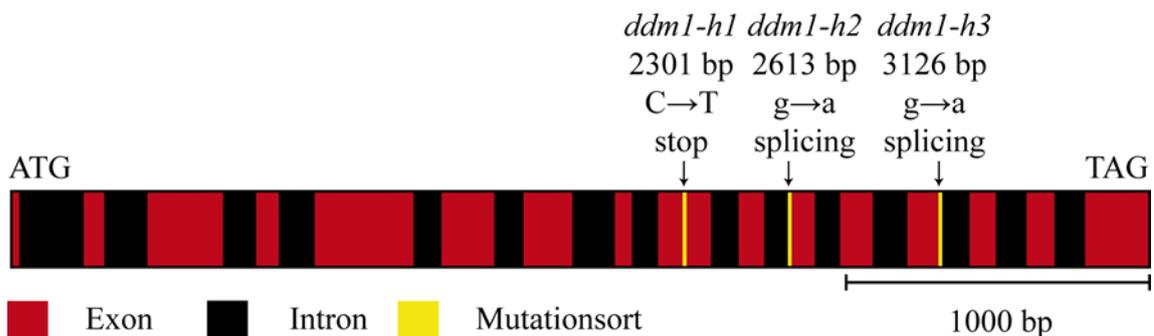


Abbildung 14: Exon/Intron-Struktur von *DDMI*. Die Abbildung zeigt die Exon/Intron-Struktur von *DDMI* sowie die Mutationsorte der Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3*. Die Exons sind als rote und die Introns als schwarze Boxen dargestellt. Die Mutationsorte werden durch gelbe Markierungen angezeigt. Die Nukleotidsubstitution bei der Mutante *ddm1-h1* läßt ein Stop-Codon entstehen, während sich die Substitutionen in den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h3* am Exon/Intron-Übergang befinden und fehlerhaftes Spleißen verursachen.

Die RT-PCR-Analysen wurden mit den Primerpaaren *ddm1*RT, aus dem 5'-Bereich des Gens, und *ddm1*F3 aus dem 3'-Bereich durchgeführt. Für die Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* wurden nur geringe Transkriptmengen nachgewiesen (Abb. 15). Dagegen zeigt die RT-PCR-Analyse der Mutante *ddm1-h3* keine Verringerung der Transkriptmenge, sondern ein gleich starkes Signal wie der *Arabidopsis thaliana* Wildtyp *Columbia* (Abb. 15). Danach wurde die Auswirkung der Mutation in der Mutante *ddm1-h3* auf die cDNA überprüft. Zu diesem Zweck wurde mit dem Primerpaar Mut12/2/7 aus der cDNA des Wildtyps und der Mutante *ddm1-h3* ein Fragment amplifiziert, das den Bereich der Punktmutation umschließt. Dabei wurde bei der Mutante *ddm1-h3* ein um das Intron 13 (85 bp) verlängertes Amplifikationsprodukt festgestellt (Abb. 15).

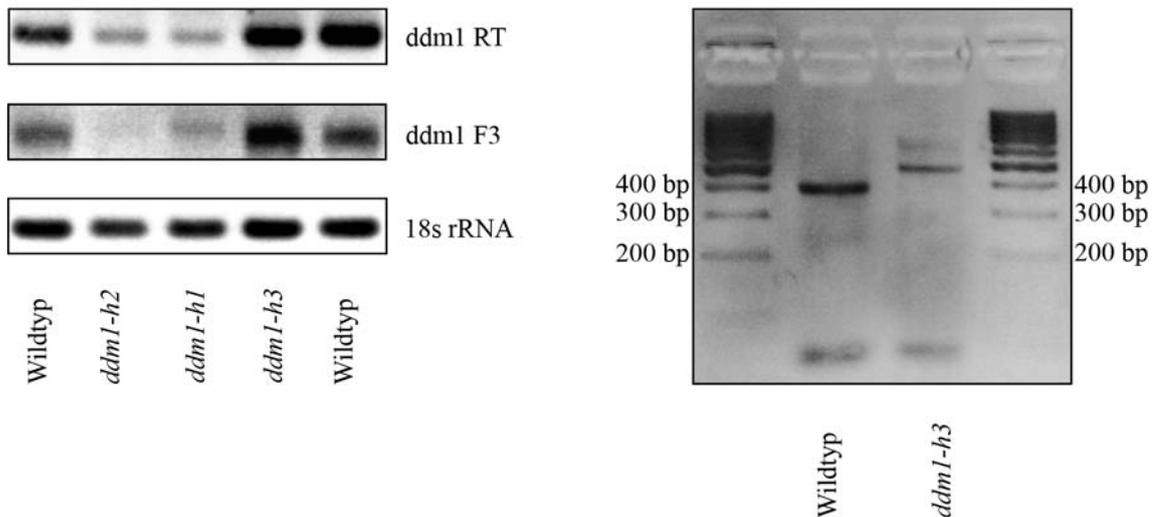


Abbildung 15: Semiquantitative RT-PCR-Analysen der *ddm1*-Mutanten und Analyse der DDM1 cDNA im Wildtyp und der Mutante *ddm1-h3*. Links: Ergebnis der RT-PCR-Analysen für die *ddm1*-Mutanten *ddm1-h2*, *ddm1-h1* und *ddm1-h3*. Unter Verwendung der lokusspezifischen Primer *ddm1* RT und *ddm1* F3 wurde bei den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Transkriptmenge beobachtet. Die Transkriptakkumulation bei der Mutante *ddm1-h3* unterscheidet sich nicht vom Wildtypniveau. Die Kontrolle der verwendeten RNA-Mengen wurde mit Primern der 18S rDNA durchgeführt. Rechts: Mit dem Primerpaar Mut12/2/7 wurde bei der Mutante *ddm1-h3* ein im Vergleich zum Wildtyp größeres Transkript nachgewiesen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Mutantenanalyse

	<i>ddm1-h2</i>	<i>ddm1-h1</i>	<i>ddm1-h3</i>
Morphologischer Phänotyp der Mutantengeneration	kein Unterschied zum Wildtyp		breite, gewellte und in sich gedrehte Blätter, Verlust der Apikaldominanz, mehrere Blattrosetten, kurze Infloreszenz
Morphologischer Phänotyp der Kartierungspopulation	kein Unterschied zum Wildtyp		
Transgenreaktivierung in der Mutantengeneration	sehr stark		schwach
Transgenreaktivierung in der Kartierungspopulation	sehr stark		mittel
DNA-Methylierung	sehr stark reduziert		
Mutationsort	At5g66750 (<i>DDMI</i>)		
gekoppelte Marker	SNPK1F13 bei 26543550 bp, SNPMuD21 bei 26714006 bp		
Mutation in der Nukleotidsequenz	Punktmutation am Exon/Intron-Übergang in Position 2613 g→a	Punktmutation in Position 2301 C→T	Punktmutation am Exon/Intron-Übergang in Position 3126 g→a
Mutation in der Aminosäuresequenz	vorzeitiges Translationssignal infolge nicht erfolgten Spleißens	Aminosäureaustausch in Position 460 CAG→TAG Gln→STOP	vorzeitiges Translationssignal infolge nicht erfolgten Spleißens
RT-PCR	reduzierte Transkriptmenge		starkes Transkript

3.4 Identifizierung und Analyse der TGS-Suppressormutante *rnr1-h1*

Die Mutante *rnr1-h1* ist durch einige charakteristische morphologische Veränderungen gekennzeichnet (Abb. 16 B). Der pleiotrope Phänotyp macht sich zunächst durch bleiche Primärblätter bemerkbar. Später zeigen die Blätter eine vergleichsweise schmalere und unregelmäßige Form mit gesägtem Blattrand. Die Blattoberfläche ist sehr unregelmäßig mit Ausbuchtungen durchzogen. Die Blattfärbung ist insgesamt heller und weist eine unregelmäßige Panaschierung auf. Die Blüteninduktion setzt hier ebenso wie die Seneszenz verfrüht ein. Bereits vor Blühbeginn ist ein Absterben der Blätter zu beobachten.

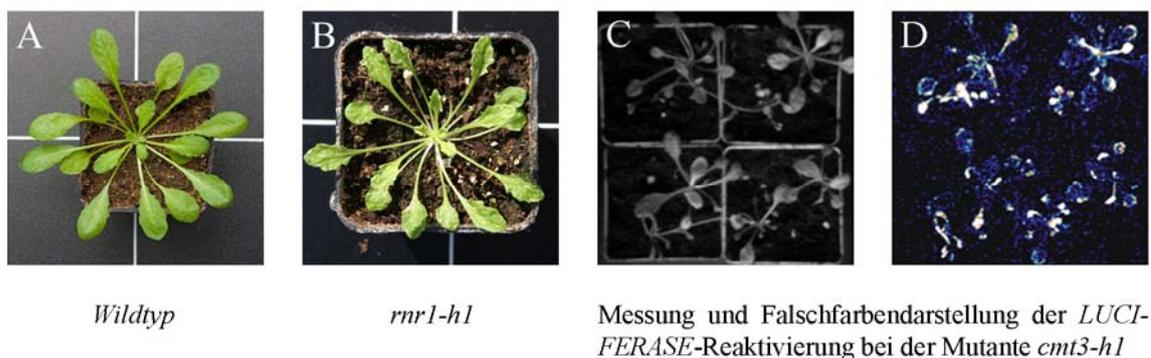


Abbildung 16: Morphologischer Phänotyp und *LUCIFERASE*-Aktivität bei der Mutante *rnr1-h1*. Charakteristischer morphologischer Unterschied zwischen der Mutante *rnr1-h1* (B) und dem Wildtyp (A), sowie die Intensität der *LUCIFERASE*-Aktivität in der Mutante *rnr1-h1* (D). Die Blätter der Mutante *rnr1-h1* sind zunächst bleich. Später nehmen sie eine hellgrüne Färbung mit unregelmäßiger Panaschierung an. Die Blattform ist uneinheitlich, vergleichsweise schmal und weist einen gesägten Blattrand auf. Die Blattoberfläche ist sehr unregelmäßig mit Ausbuchtungen durchzogen. Das Falschfarbenbild der *LUCIFERASE*-Aktivität (D) kennzeichnet in der Mutante *rnr1-h1* eine starke Transgenexpression.

Die Transgenreaktivierung fällt bei dieser Mutante stark aus (Abb. 16 D) und kosegregiert in der F₂-Generation, nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg*, mit dem pleiotropen Phänotyp.

Die Methylierung der Reportergene ist hier im Vergleich zur Ausgangslinie 12 unverändert (Abb. 17). Das heißt, daß weder für das CpG- noch für das CpNpG-Motiv eine signifikante Veränderung der Restriktionsfragmentmuster beobachtet werden konnte (Abb. 17).

Anhand der bleichen Primärblätter konnte die Selektion der Kartierungspopulation bereits im Keimlingsstadium durchgeführt werden. Dabei war es möglich über 190 Pflanzen auszuwählen. Die Kartierung des putativen Mutationsortes ergab eine Kopplung auf Chromosom 2 zwischen ca. 35 cM und 40 cM. Durch Etablierung weiterer Mikrosatelliten-Marker konnte der Mutationsort auf BAC F7D8 zwischen den

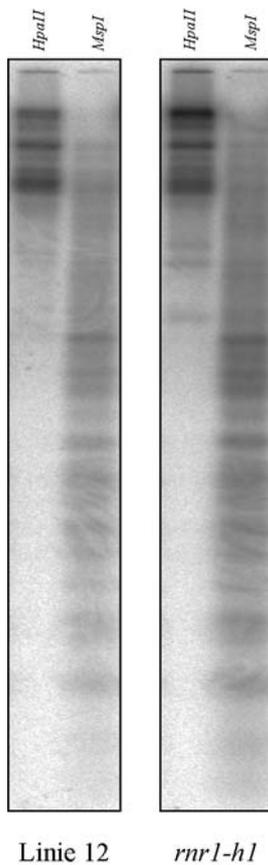


Abbildung 17: DNA-Methylierung in der Mutante *rnr1-h1*. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der *Southern*-Analyse für die Mutante *rnr1-h1*. Im Vergleich zur Ausgangslinie 12 wurde bei der Mutante *rnr1-h1* kein charakteristischer Verlust der Cytosin-Methylierung in den Motiven CpG und CpNpG festgestellt.

Markern F2G1 mit noch zwei Rekombinationen und T16B14 III mit einer Rekombination auf einen 132812 bp großen Bereich eingegrenzt werden. Der Marker F2G1 liegt auf BAC F2G1 bei 9245744 bp. Der Marker T16B14 III befindet sich auf BAC F7D8 bei 9378556 bp im 5714 bp großen Überlappungsbereich zwischen den BACs F7D8 und T16B14. Mit Hilfe von Datenbanken wurden die auf BAC F7D8 annotierten *Loci* auf eine mögliche Bedeutung für *transcriptional gene silencing* überprüft. Dabei wurden die *Loci* At2g21710 (*mitochondrial transcription termination factor-related/mTERF-related*), At2g21790 (große Untereinheit der Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase), At2g21810 (Zinkfingerprotein), At2g21830 (DC1-Domänen-Protein), At2g21840 (Zinkfingerprotein), At2g21850 (DC1-Domänen-Protein), At2g21900 (WRKY-DNA-Bindeprotein), At2g21930 (F-Box Protein) und At2g21950 (SKP1 *interacting partner*) aufgrund ihrer Bedeutung für Transkription, DNA-Bindung und DNA-Synthese sowie Proteolyse für weitere Untersuchungen mittels RT-PCR-Analyse und Sequenzanalyse ausgewählt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt die Marker, für die noch rekombinante Chromosomen nachgewiesen werden konnten, *Loci* auf BAC F7D8, die aufgrund ihrer Annotierungsdaten untersucht wurden, sowie die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse und Sequenzanalyse.

Marker bzw. annotierter <i>Locus</i>	Beschreibung	Anzahl rekombinanter Chromosomen	Koordinaten (bp) auf Chromosom 2	Ergebnis der RT-PCR-Analyse	Ergebnis der Sequenzanalyse
PLS3	SSLP-Marker	8	9001884 - 9002058		
PLS5	SSLP-Marker	3	9178570 - 9178697		
F2G1	SSLP-Marker	2	9245744 - 9245851		
At2g21710	<i>mitochondrial transcription termination factor-related/mTERF-related</i>		9277966 - 9280498	keine Veränderung	keine Mutation
F2G1 III	CAPS-Marker	0	9276550 - 9276893		
F7D8	SSLP-Marker	0	9297160 - 9297296		
At2g21790	große Untereinheit der Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase		9300435 - 9304922	reduzierte Transkriptmenge	Punktmutation
At2g21810	Zinkfingerprotein		9309334 - 9309720	keine Veränderung	keine Mutation
At2g21830	DC1-Domänen-Protein		9310793 - 9312977	keine Veränderung	keine Mutation
At2g21840	Zinkfingerprotein		9314182 - 9317138	keine Veränderung	keine Mutation
At2g21850	DC1-Domänen-Protein		9322298 - 9325318	keine Veränderung	keine Mutation
At2g21900	WRKY-DNA-Bindeprotein		9341229 - 9343302	keine Veränderung	keine Mutation
At2g21930	F-Box Protein		9354721 - 9356208	keine Veränderung	keine Mutation

At2g21950	<i>SKP1 interacting partner 6</i>		9360245 - 9361725	keine Veränderung	keine Mutation
T16B14 III	SSLP-Marker	1	9378556 - 9378804		
T16B14 II	SSLP-Marker	1	9389454 - 9389709		
T16B14	SSLP-Marker	1	9409878 - 9410144		
T26C19	SSLP-Marker	1	9428364 - 9428625		
F14M13	SSLP-Marker	2	9502688 - 9502809		
T30C20	SSLP-Marker	3	9683764 - 9683832		
PLS7	SSLP-Marker	6	9813750 - 9813858		

Im Rahmen der durchgeführten semiquantitativen RT-PCR-Analysen konnte für den *Locus* At2g21790, der die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR1) kodiert, eine Reduzierung der Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abb. 18).

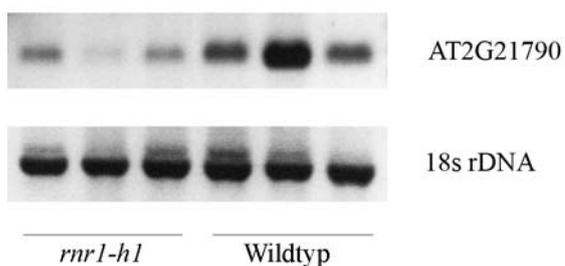


Abbildung 18: Semiquantitative RT-PCR-Analyse am *Locus* At2g21790 in der Mutante *rnr1-h1*. Unter Verwendung des lokusspezifischen Primerpaars AT2G21790 F und R wurde bei der Mutante *rnr1-h1* eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Transkriptmenge festgestellt. Die Kontrolle der verwendeten RNA-Mengen wurde mit Primern der 18S rDNA durchgeführt.

Die anschließenden Sequenzanalysen ergaben ausschließlich für diesen *Locus* eine Punktmutation. Im Ergebnis der Sequenzierung wurde in Position 3798 der nicht gespleißten Nukleotidsequenz des *Locus* At2g21790 eine Punktmutation nachgewiesen (Abb. 19). Dabei wurde die Base Guanin (G) durch Adenin (A) substituiert. Diese Substitution bewirkt einen Aminosäureaustausch in Position 763 der Aminosäuresequenz der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR1), in dessen Folge die Aminosäure Alanin (A, Ala) durch Threonin (T, Thr) ersetzt wird.

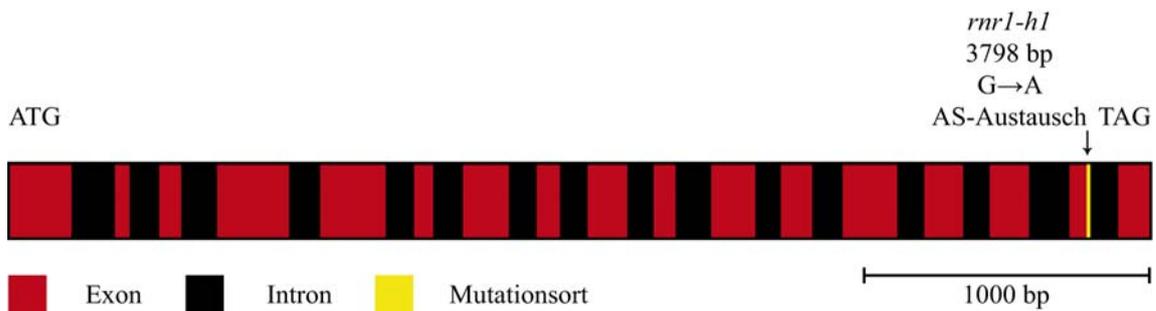


Abbildung 19: Exon/Intron-Struktur von *RNR1*. Die Abbildung zeigt die Exon/Intron-Struktur von *RNR1* sowie den Mutationsort in der Mutante *rnr1-h1*. Die Exons sind als rote und die Introns als schwarze Boxen dargestellt. Der Mutationsort wird von einer gelben Markierung angezeigt. Die Nukleotidsubstitution in der Mutante *rnr1-h1* verursacht einen Aminosäureaustausch in Position 763 der Proteinsequenz der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase.

3.4.1 Komplementation der TGS-Suppressormutante *rnr1-h1*

Zum endgültigen Nachweis, daß die gefundene Mutation die Ursache des TGS-Suppressorphänotyps sowie des beobachteten morphologischen Phänotyps der Mutante *rnr1-h1* ist, wurde eine Komplementation der Mutante *rnr1-h1* mit dem Wildtyp-Allel des *Locus* At2g1790 durchgeführt. Dafür wurde die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase aus dem BAC-Clon F7D8 kloniert und unter Verwendung des binären Vektors pCB302 eine Transformation durchgeführt. Der binäre Vektor pCB302 enthält das Basta-Resistenzgen *BAR*. Die mit diesem Vektor mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformierten Pflanzen lassen sich nach besprühen mit dem Herbizid Basta® (Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Sinsheim) selektieren. Auf diese Weise wurden 23 bastaresistente Pflanzen selektiert. Die durch transgene Expression des Wildtyp-Allels komplementierten *rnr1*-Mutanten (*phenotypic rescue*) zeigten alle eine signifikante Komplementation sowohl des TGS-Suppressorphänotyps als auch des morphologischen Phänotyps (Abb. 20). Da diese Pflanzen wieder den Wildtypphänotyp zeigten und keine *LUCIFERASE*-Aktivität mehr aufwiesen, konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Punktmutation im *Locus* At2g21790 tatsächlich die Ursache sowohl für den TGS-Suppressorphänotyp als auch für den morphologischen Phänotyp ist.

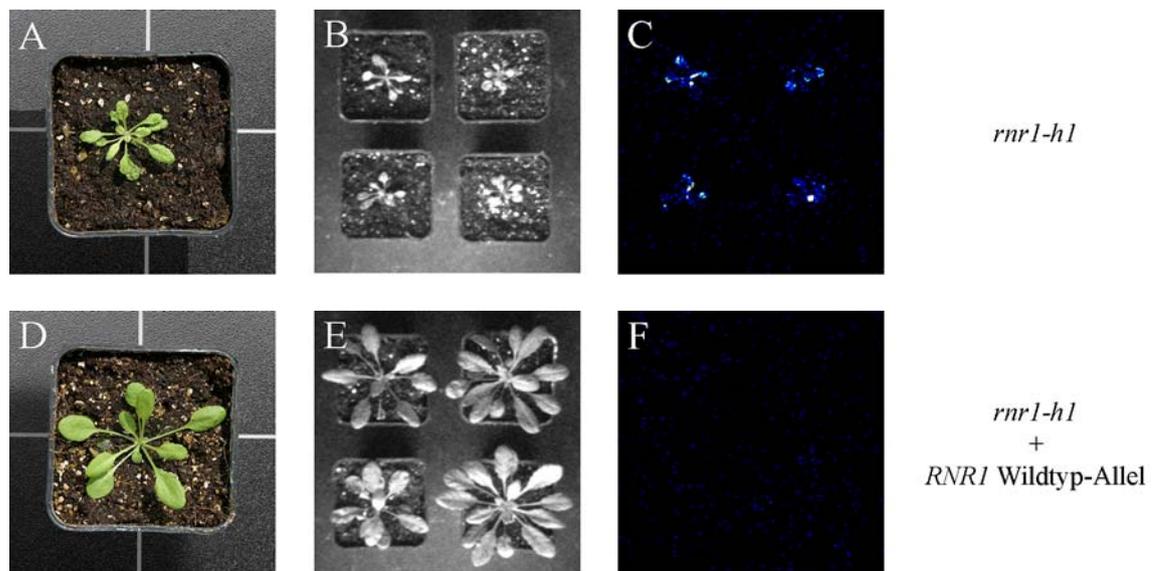


Abbildung 20: Komplementation der Mutante *rnr1-h1* mit dem Wildtyp-Allel *RNRI*. Die Abbildung zeigt den morphologischen Phänotyp sowie das Falschfarbenbild der *LUCIFERASE*-Expression der *rnr1*-Mutante *rnr1-h1* vor und nach der Komplementation mit dem Wildtyp-Allel der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (*RNRI*). Der in Farbe und Form sehr charakteristische Mutantenphänotyp (A) verschwindet nach der Komplementation und die Mutante gleicht wieder dem Wildtypphänotyp (D). Das Falschfarbenbild zeigt vor der Komplementation eine für diesen Mutantentyp bezeichnende Transgenreaktivierung (C). Nach der Komplementation mit dem Wildtyp-Allel konnte auf dem Falschfarbenbild keine *LUCIFERASE*-Expression erkannt werden (D).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Mutantanalyse

	<i>rnrl-h1</i>
Morphologischer Phänotyp der Mutantengeneration	bleiche Primärblätter, schmale und unregelmäßige Blattform mit gesägtem Blattrand, unregelmäßig ausgebuchtete Blattoberfläche, helle Blattfärbung mit unregelmäßiger Panaschierung, frühe Blüteninduktion, frühe Seneszenz
Morphologischer Phänotyp der Kartierungspopulation	kosegregiert mit der Transgenreaktivierung
Transgenreaktivierung in der Mutantengeneration	stark
Transgenreaktivierung in der Kartierungspopulation	stark
DNA-Methylierung	unverändert
Mutationsort	At2g21790 (<i>RNRI</i>)
gekoppelter Marker	F2G1 bei 9245744 bp, T16B14 III bei 9378556 bp
Mutation in der Nukleotidsequenz	Punktmutation in Position 3798 G→A
Mutation in der Aminosäuresequenz	Aminosäureaustausch in Position 763 CAG→TAG Ala→Thr
RT-PCR	reduzierte Transkriptmenge

3.5 Die Mutante 12/1/7 – Mutation im Zentromerbereich

Die Mutantenlinie 12/1/7 weist einige sehr deutliche morphologische Unterscheidungsmerkmale zum Wildtyp auf (Abb. 21). Die Blätter sind schmal und mit einem stark gesägten Blattrand ausgestattet. Sie besitzen eine gelbliche Färbung und werden von grünen Blattadern durchzogen. Auch die Blattbehaarung weicht deutlich vom Wildtyp ab. Sie ist bei der Mutantenlinie 12/1/7 deutlich dichter ausgeprägt als beim Wildtyp. Die Mutation in der Linie 12/1/7 wirkt sich ebenfalls auf die Entwicklungsprozesse aus. So erfolgt das Wachstum deutlich langsamer.

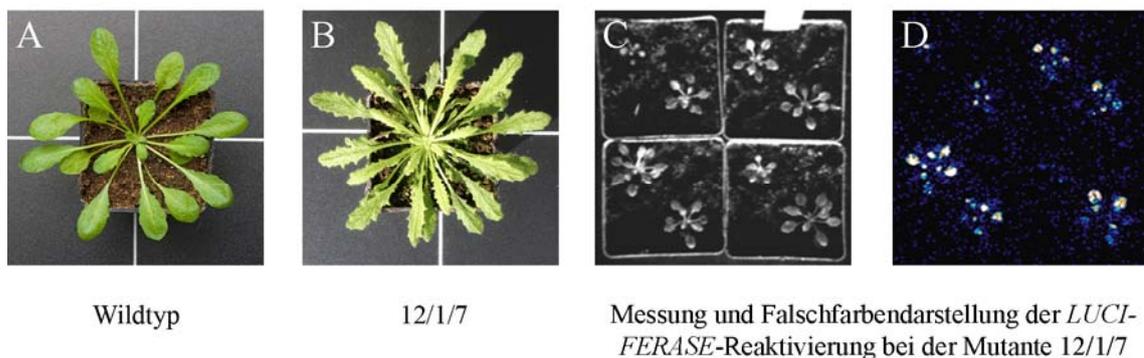


Abbildung 21: Morphologischer Phänotyp und Transgenexpression bei der Mutante 12/1/7. Die Abbildung zeigt den TGS-Suppressorphänotyp (A) und den morphologischen Phänotyp der Mutante 12/1/7 (B) sowie die Intensität der *LUCIFERASE*-Aktivität in der Mutante 12/1/7 (D). Die Blätter der Mutante 12/1/7 (B) haben eine gelbliche Färbung und werden von grünen Blattadern durchzogen. Die Blattform ist einheitlich, schmal und weist einen stark gesägten Blattrand auf (B). Das Falschfarbenbild der *LUCIFERASE*-Aktivität (D) in der Mutante 12/1/7 zeigt eine mittelstarke Transgenexpression.

Die Transgenreaktivierung fällt bei der Mutantenlinie 12/1/7 mittelstark aus (Abb. 21 D). In der F₂-Population, nach vorangegangener Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg*, konnte eine Kosegregation von Transgenreaktivierung und morphologischen Phänotyp festgestellt werden. Für den Aufbau einer Kartierungspopulation konnten so 115 Pflanzen aus der F₂-Population eingebracht werden.

Mit der *Southern*-Analyse konnte keine Veränderungen der DNA-Methylierung des Reportergens nachweisen werden (Abb. 22). Wie bereits bei der im Abschnitt 3.4 beschriebenen Linie *rnr1-h1* beeinflusst die Mutation *transcriptional gene silencing*, verursacht aber dabei weder im CpG-Motiv noch im CpNpG-Motiv eine Hypomethylierung (Abb. 22).

Im Rahmen der Kartierung ist es gelungen eine Kopplung der SSLP-Marker F26C17II bei 10180644 bp und SNPT2L5 bei 13222572 bp auf Chromosom 5 mit dem putativen Mutationsort nachzuweisen. Eine abschließende Identifizierung des Mutationsortes

erwies sich jedoch als schwierig und konnte aufgrund seiner Position in der perizentrischen Region nicht abschließend fertig gestellt werden. Da Rekombination in der Nähe der Zentromere oft unterdrückt wird (Nachman 2002), war der Einsatz PCR-basierter Marker zur Selektion des Mutationsortes nur eingeschränkt möglich. Die letzten SSLP-Marker, die noch Rekombinationen aufwiesen, waren F26C17II bei 10180644 bp und SNPT2L5 bei 13222572 bp. Die weiter innen liegenden Marker NGA76 bei 10418614 bp und SNPF3F24II 10960095 bp wiesen bereits keine Rekombination auf. Auf diese Weise konnte der Mutationsort auf einen Bereich von 3041883 bp mit mehr als 600 annotierten *Loci* eingegrenzt werden.



Abbildung 22: DNA-Methylierung in der Mutante 12/1/7. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der *Southern*-Analyse für die Mutante 12/1/7. Im Vergleich zur Ausgangslinie 12 wurde bei der Mutante 12/1/7 kein charakteristischer Verlust der Cytosin-Methylierung in den Motiven CpG und CpNpG festgestellt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Mutantanalyse

	12/1/7
Morphologischer Phänotyp der Mutantengeneration	schmale, gelblich gefärbte Blätter mit grünen Blattadern, stark gesägter Blattrand, starke Blattbehaarung, langsames Wachstum
Morphologischer Phänotyp der Kartierungspopulation	Kosegregiert mit Transgenreaktivierung
Transgenreaktivierung in der Mutantengeneration	mittelstark
Transgenreaktivierung in der Kartierungspopulation	mittelstark
DNA-Methylierung im Motiv CpG	unverändert
DNA-Methylierung im Motiv CpNpG	unverändert
Mutationsort	perizentrische Region
gekoppelter Marker	F26C17II bei 10180644 bp, SNPT2L5 bei 13222572 bp

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer Modifikatoren für *transcriptional gene silencing* (TGS) in *Arabidopsis thaliana*. Die Selektion von Mutanten mit defekten Modifikatoren für *transcriptional gene silencing* wurde mit einem neuen transgenen Testsystem in *Arabidopsis thaliana* mit *LUCIFERASE* als transgenen Reporter durchgeführt (Hofmann 2004). Mit der *Southern*-Analyse wurde der Einfluß defekter TGS-Modifikatoren auf die DNA-Methylierung überprüft. Durch markergestützte Kartierung putativer Mutationsorte und anschließender Sequenzierung der Kandidatengene konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion bereits charakterisierter TGS-Modifikatoren sowie neue TGS-Modifikatoren gefunden werden.

4.1 Charakterisierung der *met1*-Mutanten

Morphologische Phänotypen der *met1*-Mutanten

Die in dieser Arbeit analysierten *met1*-Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* weisen sowohl morphologische Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zu den bereits in der Literatur charakterisierten *met1*-Mutanten und transgenen *asMET1*-Pflanzen auf.

Bei den hier untersuchten *met1*-Mutanten treten, wie bereits von Finnegan *et al.* (1996) beschrieben, unterschiedliche Blattform, Blattgröße, wie auch nach oben gerollte Blattränder auf. Die Blätter sind sehr schmal mit stark gesägten Blatträndern. Bei den Mutanten *met1-h2* und *met1-h3* drehen sich die Blattränder deutlich nach oben, während diese morphologische Erscheinungsform bei der Mutante *met1-h1* nur an einzelnen Blättern vorkommt. Die bereits vor der Blütenbildung einsetzende Ausbildung von Nebenblättern der Blattrosette sowie eine dichte Beblätterung der Infloreszenz wurden ebenfalls von Kankel *et al.* (2003) für diesen Mutantentyp festgestellt. Auffällig ist auch die veränderte Anzahl der Blütenorgane mit bis zu 6 Blütenblättern und 8 Staubgefäßen. Finnegan *et al.* (1996) sowie Kishimoto *et al.* (2001) haben in transgenen *asMET1*-Pflanzen den gleichen Blütenphänotyp mit erhöhter Anzahl an *Stamen* beschrieben, wie in *loss-off-function superman*-Mutanten (*sup*-Mutanten). Auch die nahezu vollständige weibliche Sterilität (Finnegan *et al.*

1996) sowie der Spätblüh-Phänotyp (Finnegan *et al.* 1996) traten bei den hier untersuchten *met1*-Pflanzen auf. Ein Verlust der Apikaldominanz sowie ein kleinerer und buschiger Habitus (Finnegan *et al.* 1996) konnten jedoch ebenso wenig beobachtet werden wie eine verdickte Infloreszenz (Kankel *et al.* 2003). Dagegen zeigten die hier analysierten *met1*-Mutanten ein verlangsamtes Wachstum. Bei der Mutante *met1-h1* tritt der morphologische Phänotyp abgeschwächt in Erscheinung und auch die Fertilität ist etwas besser ausgeprägt.

Die Ursache für den Spätblüh-Phänotyp wird mit der Hypomethylierung der *upstream* Region des *flowering time Locus FWA* begründet (Kakutani *et al.* 1996, Soppe *et al.* 2000, Lindroth *et al.* 2001, Cao und Jacobsen 2002b, Saze *et al.* 2003). Dieser Methylierungsverlust führt zu einer erhöhten Expression des *FWA*-Gens und einen dominant vererbten Spätblüh-Phänotyp (Kakutani *et al.* 1996, Soppe *et al.* 2000, Lindroth *et al.* 2001, Cao und Jacobsen 2002b, Saze *et al.* 2003). Lippman *et al.* (2004) machen in *met1*-Mutanten den Verlust der RNA-vermittelten DNA-Methylierung transposabler Elemente des *FWA*-Gens in der weiblichen Keimbahn für den Verlust der heterochromatischen Modifizierung und für die spezifische Expression des maternalen Allels während der Samenentwicklung verantwortlich. Kankel *et al.* (2003) konnten zeigen, daß der Spätblüh-Phänotyp, unabhängig von *met1*, durch vererbte Variation verursacht wird. Dieser Funktionsverlust verursacht ein stabiles epigenetisches Allel (Epi-Allel) des *FWA-Locus* (Soppe *et al.* 2000, Kankel *et al.* 2003), das nach einer Kreuzung mit dem Wildtyp auch im nicht *met1*-Hintergrund stabil weitergegeben wird (Kankel *et al.* 2003). Die Hypomethylierung des *FWA*-Allels in der *MET1/met1* F₂-Generation zeigt, daß, im Gegensatz zu DDM1, MET1 bereits im haploiden Gametophyten aktiv ist (Kankel *et al.* 2003).

Kankel *et al.* (2003) nennen im Zusammenhang mit *met1*-Mutanten auch eine verzögerte Seneszenz und begründen diese Entwicklungsverzögerung mit der verspäteten Ausbildung von Trichomen an Rosettenblättern. Während juvenile Rosettenblätter noch keine Trichome ausgebildet haben, sind diese bei adulten Blättern vorhanden (Kankel *et al.* 2003). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen wurde zwar eine reduzierte Blattbehaarung beobachtet, diese Beobachtungen wurden jedoch nicht in allen Entwicklungsstadien durchgeführt, so daß diesbezüglich keine Aussage gemacht werden kann. Im Gegensatz zu der bei Kankel *et al.* (2003) beobachteten verzögerten Seneszenz bei *met1*-Mutanten konnte bei der Mutantenlinie *met1-h2* eine verfrüht einsetzende Blattseneszenz beobachtet werden.

Kankel *et al.* (2003) haben ihr *met1-1*-Allel, hinsichtlich des Phänotyps, als eindeutig rezessiv klassifiziert. Dagegen wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten *met1*-Mutanten ein partiell dominanter Erbgang festgestellt.

Die phänotypische Variabilität in heterozygoten *met1*-Pflanzen hat ihre Ursache in der Kombination methylierter und hypomethylierter *Loci* (Saze *et al.* 2003). Bei der Teilung haploider Zellen, die das *met1*-Allel tragen, erfolgt eine passive postmeiotische Demethylierung (Saze *et al.* 2003). So kann MET1 erst in der Zygote hemimethylierte DNA remethylieren (Saze *et al.* 2003). Da weibliche *Arabidopsis* Gameten drei postmeiotische Teilungen (Mitosen) durchlaufen, während Samenzellen nur zwei postmeiotische Teilungen (Mitosen) durchlaufen (Lord und Russell 2002, Saze *et al.* 2003) enthalten vor der Befruchtung 75% der Eizellen und 50% der Samenzellen völlig demethylierte und je 25% und 50% hemimethylierte DNA (Saze *et al.* 2003). So erfolgen epigenetische Änderungen eines *Locus* nur dann, wenn er von einem *met1*-Gameten weiter gegeben wird (Saze *et al.* 2003). Diese Kombination methylierter und hypomethylierter *Loci* in heterozygoten *met1*-Pflanzen macht den phänotypischen Variationsreichtum aus und spiegelt die unabhängige epigenetische Segregation wieder (Saze *et al.* 2003).

Diese morphologischen Veränderungen und Entwicklungsstörungen treten in *met1*-Mutanten bereits in der ersten homozygoten Mutantengeneration auf, während entsprechende Veränderungen bei *ddm1*-Mutanten erst nach einigen Generationen der Selbstung beobachtet werden konnten (Finnegan *et al.* 1996 Kakutani *et al.* 1996 Ronemus *et al.* 1996 Soppe *et al.* 2002).

Kankel *et al.* (2003) konnten bei ihrer *met1-2*-Mutante keine Entwicklungsstörungen oder morphologischen Veränderungen feststellen. Da diese Mutante jedoch nur zu 50% im CpG-Motiv hypomethyliert war, scheint dies wohl noch nicht hinreichend zu sein, um morphologische Veränderungen und Entwicklungsstörungen auszulösen.

Die häufig beschriebenen phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *met1*- und *ddm1*-Mutanten (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996, Jacobsen *et al.* 2000, Kakutani *et al.* 1996) konnten für das hier untersuchte Mutantenmaterial nicht bestätigt werden. Auch Cao und Jacobsen (2002b) konnten keine phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *met1*- und *ddm1*-Mutanten feststellen.

Eine andere Erklärung für den partiell dominanten Erbgang der pleiotropen Phänotypen bei allen drei Mutanten ist, daß der Spätblüh-Phänotyp, bedingt durch das *fwa* Epi-Allel, semidominant ist (Soppe *et al.* 2000), sich aber meistens rezessiv verhält (Kankel *et al.* 2003).

Auswirkungen der MET1-Insuffizienz auf die DNA-Methylierung

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *Southern*-Analysen wurde gezeigt, daß die untersuchten *met1*-Mutanten *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* deutlich hypomethyliert sind. Während sich die Mutanten *met1-h2* und *met1-h1* geringfügig bezüglich der Hypomethylierung unterscheiden, ist die Mutante *met1-h3* in beiden Motiven unterschiedlich stark hypomethyliert (siehe auch Seite 58: „Proteinaktivität von MET1“). Dabei ist CpG-Methylierung zwar vorhanden, aber deutlich geringer als in der Ausgangslinie 12. So wirkt sich die Position der Punktmutation in allen drei *met1*-Mutanten unterschiedlich auf die Cytosin-Methylierung aus. Bei der Mutante *met1-h3* ist durch eine gewisse MET1-Restaktivität die Fähigkeit zur CpG-Methylierung noch vorhanden. Eine ähnliche Mutante wurde von Tariq *et al.* (2003) beschrieben. Bei dieser *met1*-Mutante wurde ebenfalls eine partielle Reduktion der CpG-Methylierung festgestellt (Tariq *et al.* 2003).

Die Selektion der Kartierungspopulation für die Mutanten *met1-h2* und *met1-h3* erfolgte durch Auswertung der *Southern*-Analysen. Dies war notwendig, weil mit dem transgenen Testsystem für *transcriptional gene silencing* auch bezüglich des Mutationsortes heterozygote F₂-Pflanzen erfaßt wurden. Dabei wurde festgestellt, daß Pflanzen, die bezüglich des Mutationsortes homozygot waren, deutlich demethyliert waren. Aus diesem Grund war es mit der *Southern*-Analyse möglich, zwischen homozygoten und heterozygoten F₂-Hybriden zu differenzieren. So waren nur die homozygoten F₂-Pflanzen eindeutig hypomethyliert, während die heterozygoten eine Remethylierung aufwiesen.

Während in dieser Arbeit die Hypomethylierung der *LUCIFERASE*-Reportergene untersucht wurde, konnten Kankel *et al.* (2003) auch einen Verlust der Methylierung repetitiver Sequenzen der Zentromerregion sowie in rRNA-Genen feststellen. Auch Saze *et al.* 2003 konnten zeigen, daß in *met1*-Mutanten das CpG-Motiv der 180 bp zentromerischen *repeats* hypomethyliert ist, während Johnson *et al.* (2002b) auch im CpNpG-Motiv dieser *repeats* Hypomethylierung nachweisen konnten, ohne daß dadurch die H3K9-Dimethylierung wesentlich beeinträchtigt wurde. Des Weiteren haben Kankel *et al.* (2003) gezeigt, daß von der *met1*-Hypomethylierung auch *single copy* Gensequenzen betroffen sind. In *met1*-Mutanten und transgenen as*MET1*-Pflanzen werden im perizentrischen Heterochromatin ebenfalls Hypomethylierung sowie transkriptionelle Aktivierung von *transcriptionally silent information* (TSI) beobachtet (Steimer *et al.* 2000, Saze *et al.* 2003).

Die *met1*-bedingte Hypomethylierung kann sowohl übertragen und aufrechterhalten als auch einer Remethylierung unterzogen werden (Kankel *et al.* 2003). Dabei erfolgt die Remethylierung vormals hypomethylierter *Loci* nach Rückkreuzung methylierungsdefizienter Mutanten mit dem Wildtyp nur sehr langsam (Vongs *et al.* 1993, Finnegan *et al.* 1996, Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Kakutani *et al.* 1999, Saze *et al.* 2003). Eine solche Remethylierung vormals hypomethylierter Sequenzen konnten Ronemus *et al.* (1996) für den Fall eines wegsegregierten *asMET1*-Transgens nachweisen. Auch Finnegan *et al.* (1996) konnten in Nachkommen transgener *asMET1*-Pflanzen 10% bis 100% Demethylierung, vor allem im CpG-Motiv, beobachten, die von der Anzahl der Transgenkopien abhing. Nach Herauskreuzen des *antisense* Konstruktes konnte jedoch das Wildtypmethylierungsniveau nicht vollständig hergestellt werden, so daß angenommen werden muß, daß Methylierung meiotisch vererbt wird (Finnegan *et al.* 1996). Soppe *et al.* (2002) konnten anhand heterozygoter *met1*-F₁-Hybriden zeigen, daß MET1 einmal hypomethylierte DNA in den Chromozentren nicht remethylieren kann, was im Einklang mit der Rolle von MET1 bei der Aufrechterhaltung von DNA-Methylierung steht. Die Unfähigkeit zur Remethylierung repetitiver Sequenzen in *met1*-Mutanten verhindert jedoch nicht *de novo* Methylierung transgener *multycopy* Sequenzen sowie endogener Gene (Soppe *et al.* 2002).

In *met1*-Mutanten werden, neben der CpG-Methylierung (Finnegan *et al.* 1996, Kishimoto *et al.* 2001), auch CpNpG- und CpNpN-Sequenzen beeinträchtigt (Bartee und Bender 2001, Lindroth *et al.* 2001). Cao und Jacobsen (2002b) konnten zeigen, daß in *met1*-Mutanten CpNpG-Methylierung sowie asymmetrische Methylierung im *FWA-Locus* und den *MEA-ISR repeats* sowie CpNpG-Methylierung im *TA3* Retrotransposon und den zentromerischen *repeats* stark reduziert sind. Cao und Jacobsen (2002b) führen den Verlust der CpNpG-Methylierung sowie der asymmetrischen Methylierung in *met1*-Mutanten auf einen sekundären Effekt, basierend auf den primären Verlust der CpG-Methylierung zurück, während Kato *et al.* (2003) MET1 keine Bedeutung bei der nicht-CpG-Methylierung zusprechen. Dagegen konnten Kishimoto *et al.* (2001) auch in transgenen *asMET1*-Pflanzen eine geringere Methylierung asymmetrischer Cytosine beobachten als in Pflanzen mit aktivem *MET1*-Gen und schließen, daß MET1 direkt oder indirekt asymmetrische Methylierung beeinflusst. Dabei könnte CpG-Methylierung als Signal für weitere Cytosin-Methylierungen innerhalb anderer Motive dienen (Cao und Jacobsen 2002b). Dagegen konnten Kankel *et al.* (2003) in *met1*-Mutanten lediglich einen dramatischen Verlust der CpG- sowie eine vergleichsweise moderate Reduzierung der CpNpG-Methylierung in repetitiven Genombereichen beobachten. Dies steht auch

im Einklang mit den von Zemach *et al.* (2005) gemachten Beobachtungen, daß die MBD-Proteine (*methyl-CpG binding domain proteins*) 5, 6 und 7 in erster Linie in den hoch CpG-methylierten Chromozentren lokalisiert sind, was in *met1*-Mutanten nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Kankel *et al.* (2003) machen darauf aufmerksam, daß Probleme bei der Bestimmung der Hypomethylierung mit *MspI*, das den Verlust der CpNpG-Methylierung im bestimmten Sequenzzusammenhang nicht erkennt, z. B. GGC^mCGG (Busslinger *et al.* 1983), auftreten.

Aufsatz *et al.* (2004) konnten zeigen, daß MET1 auch für die RNA-vermittelte *de novo* CpG-Methylierung des konstitutiven Nopalin-Synthase-Promotors (PNOS) verantwortlich ist, wobei die *de novo* Methyltransferasen DRM1 sowie DRM2 beteiligt zu sein scheinen. Dabei kann die *de novo* Aktivität einerseits von RNA und andererseits von bereits vorhandener CpNpG- oder gegenüber liegender CpG-Methylierung angeregt werden (Aufsatz *et al.* 2004). Dadurch wird deutlich, daß MET1 eine hohe Affinität zu Strukturen besitzt, die während der DNA-Replikation oder aus der DNA-RNA Hybridisierung entstehen (Aufsatz *et al.* 2004).

Einige *asMET1*-Pflanzen sowie *met1*-Mutanten zeigen aber auch Hypermethylierung innerhalb der kodierenden Sequenz sowie um den Transkriptionsstart des SUPERMAN *Locus* (Jacobsen *et al.* 2000, Kishimoto *et al.* 2001). Kishimoto *et al.* (2001) vermuten, daß die Repression der Transkription des SUPERMAN *Locus* nicht nur mit der Hypermethylierung, sondern primär mit Chromatinkondensation um den SUPERMAN *Locus* zusammenhängt. Demnach resultiert die Hypermethylierung in *antisense* Pflanzen aus der Aktivierung des Abwehrmechanismus gegen transposable Elemente und Fremd-DNA, der Veränderungen im Chromatin registriert (Kishimoto *et al.* 2001). Ebenso wie der SUPERMAN *Locus* ist auch der AGAMOUS *Locus* von Hypermethylierung in transgenen *asMET1*-Pflanzen jedoch nicht in *ddm2*-Mutanten (*met1*-Mutanten), betroffen (Jacobsen *et al.* 2000).

Neben DNA-Demethylierung kommt es in *met1*-Mutanten zu einer H3dimethylK9-Hypomethylierung sowie einer Reduzierung des Heterochromatins (Soppe *et al.* 2002). Von dieser Euchromatisierung sind besonders heterochromatische perizentrische *low-copy* Sequenzen betroffen (Soppe *et al.* 2002). Die verbleibende Methylierung wird der Aktivität anderer Methyltransferasen zugeschrieben (Genger *et al.* 1999, Soppe *et al.* 2002). Tariq *et al.* (2003) konnten zeigen, daß in *met1*-Null-Mutanten ein Verlust der CpG-Methylierung einen Verlust der Histon H3K9-Methylierung im Heterochromatin sowie an heterochromatischen *Loci* verursacht, aber nicht zwingend transkriptionelle Aktivität sowie Dekondensation des Heterochromatins nach sich zieht. Tariq *et al.*

(2003) folgern daraus, daß CpG-Methylierung zwingend für H3K9-Methylierung ist, daß aber der Verlust der CpG-Methylierung und H3K9-Methylierung nicht zwingend *gene silencing* revidiert. Dagegen konnten Johnson *et al.* (2002b) zeigen, daß ein Verlust der DNA-Methylierung nicht unbedingt zum Verlust der H3K9-Methylierung führt. Ein Verlust der H3K9-Methylierung kann allerdings an *Loci* beobachtet werden, die transkriptionell reaktiviert wurden und ein signifikantes Transkriptionsniveau erreicht haben (Johnson *et al.* 2002b). Johnson *et al.* (2002b) machen dafür eine Depositionierung unmethylierter Nukleosomen verantwortlich und folgern, daß H3K9-Methylierung nicht unter der Kontrolle von DNA-Methylierung steht. Demnach ist DNA-Methylierung, nicht jedoch H3K9-Methylierung, für *gene silencing* notwendig (Johnson *et al.* 2002b). Dies steht im Einklang mit Jackson *et al.* (2002) sowie Gendrel *et al.* (2002) die gezeigt haben, daß H3K9-Methylierung DNA-Methylierung voran geht, und ein Verlust der DNA-Methylierung nicht zum Verlust der H3K9-Methylierung führt. Daß jedoch auch die Aktivierung vormals inaktiver *Loci* trotz DNA-Methylierung erfolgen kann, haben Amedo *et al.* (2000) für die *mom1*-Mutanten beschrieben. MOM1 (*meurpheus' molecule*) beeinflusst zwar TGS, übt jedoch keinen Einfluß auf die DNA-Methylierung aus.

Kato *et al.* (2003) konnten zeigen, daß MET1 und CMT3 gemeinsam das endogene *CACTA* Transposon kontrollieren. Während es in *met1*- und *cmt3*-Mutanten zu einer Akkumulation von *CACTA repeats* kommt, konnte im Gegensatz dazu in Doppelmutanten keine bzw. nur geringe Transposonmobilität beobachtet werden. Kato *et al.* (2003) schlußfolgern daraus, daß CpG- und nicht-CpG-Methylierung sich redundant bezüglich der Transposonkontrolle verhalten und nicht-CpG-Methylierung bei Pflanzen in erster Linie der Transposonkontrolle dient (Tompa *et al.* 2002). Johnson *et al.* (2002b) konnte in *met1*-Mutanten für die Retrotransposonsequenz *Ta3* in der perizentrischen Region auf Chromosom 1 eine völlige Demethylierung im CpG-Motiv, aber nur eine intermediäre Demethylierung im CpNpG-Motiv feststellen. Der Effekt auf H3K9-Methylierung sowie die Reaktivierung des *Ta3* Retrotransposons fielen ebenso wie beim *Ta2* Retrotransposon in *met1*-Mutanten schwach aus (Johnson *et al.* 2002b). Aufgrund stärkerer Effekte bezüglich CpNpG-Hypomethylierung, Reduzierung der H3K9-Methylierung und *Ta3* Reaktivierung in *ddm1*- und *cmt3*-Mutanten sprechen Johnson *et al.* (2002b) der CpNpG-Methylierung eine größere Rolle beim *gene silencing* von *Ta3* zu als der CpG-Methylierung.

Ashapkin *et al.* (2002) konnten in transgenen *asMET1*-Pflanzen auch eine veränderte Adenin-Methylierung des *domains rearranged methyltransferase 2 (DRM2)* Gens, das

für die *de novo* Methyltransferase kodiert, feststellen und folgern, daß MET1 die Expression von *DRM2* sowie anderer Methyltransferase-Gene beeinflusst.

Transgenreaktivierung in *met1*-Mutanten

Die Transgenreaktivierung ist in den Mutantenlinien *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* sehr stark ausgeprägt und findet sich in der F₂-Generation nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* wieder. Eine Kosegregation von morphologischen Phänotyp und Transgenreaktivierung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die *LUCIFERASE*-Aktivität tritt bei über 25% der F₂-Pflanzen deutlich in Erscheinung und ist somit nicht vollständig rezessiv. Ebenso wie der morphologische Phänotyp weist die Transgenreaktivierung einen partiell dominanten Erbgang auf, was ebenfalls auf eine passive Demethylierung im haploiden Stadium zurückgeführt werden kann (Saze *et al.* 2003). Das Einbringen einer transgenen Zielsequenz zusammen oder unabhängig vom mutierten *met1*-Allel macht einen Unterschied, wenn die MET1-Funktion während des Überganges von einer in die nächste Generation erforderlich ist (Saze *et al.* 2003). So erfolgen epigenetische Änderungen eines transgenen *Locus* nur dann, wenn er von einem *met1*-Gameten weiter gegeben wird (Saze *et al.* 2003). Saze *et al.* (2003) konnten nach reziproker Rückkreuzung ihrer F₁ *met1/GUS*-Hybriden zeigen, daß 74,5% der Pflanzen Transgenaktivität aufweisen, wenn *met1* und der transgene *Locus* maternal vererbt werden, während dies bei paternaler Vererbung lediglich für 42% der Pflanzen zutrifft. Damit ist klar, daß MET1 schon während der Gametogenese, also im haploiden Stadium aktiv ist (Saze *et al.* 2003). Für die Remethylierung des nicht methylierten DNA-Stranges ist also ein hemimethylierter Schwesternstrang erforderlich (Saze *et al.* 2003). Die abweichenden Methylierungsmuster transgener *Loci* in heterozygoten *met1*-Pflanzen basieren auf der Kombination methylierter und hypomethylierter *Loci* und spiegeln die unabhängige epigenetische Segregation wieder (Saze *et al.* 2003). Saze *et al.* (2003) konnten zeigen, daß Hypomethylierung und Verlust von TGS im haploiden Stadium nicht durch Verschmelzung mit einem Wildtyp *MET1*-Allele revidiert werden können. Chromatinveränderungen, die während der postmeiotischen Teilung und der Embryonalentwicklung einsetzen können nicht umgehend DNA-Methylierung und TGS wieder herstellen (Saze *et al.* 2003). Hemimethylierung ist in heterozygoten Pflanzen direkt nach der Befruchtung notwendig, damit an beiden Strängen Methylierung erfolgen kann (Saze *et al.* 2003).

Hemimethylierte und völlig demethylierte *Loci* kommen gemeinsam vor, so daß neue epigenetische Varianten entstehen können (Saze et al. 2003). Postreplikatives *cross-over* sowie zufällige Chromosomensegregation in der postmeiotischen Teilung führen zur charakteristischen epigenetischen Variabilität in *met1*-Hybriden (Saze et al. 2003).

Die im Rahmen der Kartierung durchgeführte Kopplungsanalyse hat allerdings gezeigt, daß in der F₂-Generation der *met1*-Hybriden der Linien *met1-h2*, *met1-h1* und *met1-h3* das transgene Testsystem auch heterozygote Mutanten erfaßt, so daß eine Reselektion der Kartierungspopulation mittels *Southern*-Analyse durchgeführt werden mußte. Morel et al. (2000) konnten dagegen in der F₂-Generation ihrer *met1*-Hybriden einen bezüglich der Reaktivierung des *GUS*-Transgens rezessiven Erbgang nachweisen.

Morel et al. (2000) konnten zeigen, daß DNA-Methylierung und Chromatinstruktur gemeinsam TGS regulieren. *met1*-Mutanten zeigen Defizite beim TGS (Steimer et al. 2000, Morel et al. 2000, Vaucheret et al. 2001), verbunden mit einer Reduzierung der Transgenmethylierung (Morel et al. 2000, Vaucheret et al. 2001). MET1 ist zwar für die Methylierung transgener *Loci* verantwortlich, verursacht aber nicht in allen Fällen TGS, was am Beispiel des transgenen *Locus A* gezeigt werden konnte, der in *asMET1*-Pflanzen inaktiv bleibt (Morel et al. 2000). Amedeo et al. (2000) konnten dagegen zeigen, daß in *mom1*-Mutanten der transgene *Locus A* aktiv ist. Daraus folgern Morel et al. (2000), daß TGS nicht nur von der Methylierung des betroffenen *Locus*, sondern auch von seiner Struktur und Position im Genom abhängt. Demnach gibt es sowohl ein MET1-abhängiges als auch ein MET1-unabhängiges Modell für *gene silencing* in Pflanzen (Morel et al. 2000).

MET1 ist ebenfalls am PTGS beteiligt (Morel et al. 2000). Eine Beeinträchtigung von PTGS konnte jedoch nicht in allen *met1*-Mutanten beobachtet werden (Vaucheret et al. 2001). Im Gegensatz zu TGS wird PTGS in *met1*-Mutanten stufenweise im Verlauf der Pflanzenentwicklung unterdrückt (Vaucheret et al. 2001). Dies zeigt, daß MET1 bei der Aufrechterhaltung von PTGS beteiligt ist (Vaucheret et al. 2001). MET1 methyliert Transgensequenzen, die homolog zu dsRNAs sind und hält auf diese Weise den Chromatinzustand aufrecht, der für die *aberrant* RNA-Synthese (abRNA-Synthese) verantwortlich ist, die schließlich PTGS induziert (Baulcombe und English 1996, Vaucheret et al. 2001).

Proteinaktivität von MET1

Die in Folge der Sequenzanalyse des *MET1-Locus* der Mutante *met1-h2* gefundene Punktmutation resultiert in einem Stop-Codon in Position 637 der Aminosäuresequenz von MET1 und führt somit zu einem Translationsabbruch. Dagegen verursacht die Punktmutation in der Mutante *met1-h1* einen Austausch von Glutaminsäure (Glu; E) gegen Lysin (Lys; K) in Position 1272 der Aminosäuresequenz von MET1. In der Mutante *met1-h3* wird in Folge der Punktmutation in Position 1297 der Proteinsequenz von MET1 Prolin (Pro, P) durch Leucin (Leu, L) ersetzt. Diese Substitutionen liegen innerhalb der katalytischen Methyltransferase-Domäne, aber außerhalb der Methyltransferase-Motive, wie dies auch schon bei der von Kankel *et al.* (2003) beschriebene Mutante *met1-1*, mit einer Substitution in Position 1300 der Aminosäuresequenz, der Fall war. Ein anderer interessanter Aspekt bei Kankel *et al.* (2003) ist, daß eine Substitution im Methyltransferase-Motiv I, das den Methyl donor S-Adenosyl-Methionin bindet und essentiell für die Enzymfunktion ist, die genomische Spezifität und Zielorientierung der Methyltransferase beeinträchtigt.

Die RT-PCR-Analyse für die Mutante *met1-h2* ergab eine reduzierte Transkriptmenge, während die beiden anderen Mutanten gleich große Transkriptmengen wie der Wildtyp *Columbia* aufwiesen. Demnach handelt es sich bei der Mutante *met1-h2* um eine Nullmutante, in der die betroffene mRNA durch *nonsense-mediated decay* (NMD) (Maquat 1995) abgebaut wird. Im Gegensatz zur Mutante *met1-h2* resultieren die Punktmutationen in den Mutanten *met1-h1* und *met1-h3* in einem nicht voll funktionsfähigen Protein, das in der Mutante *met1-h1* keine DNA-Methyltransferaseaktivität aufweist und in der Mutante *met1-h3* zwar zur CpNpG-Hypomethylierung führt, aber die Fähigkeit zur CpG-Methylierung nicht vollständig verloren hat. Die verbleibende Methylierung kann einerseits mit einer Restaktivität von MET1 begründet werden, andererseits können dafür andere *Arabidopsis*-Methyltransferasen verantwortlich gemacht werden (Kankel *et al.* 2003). So lassen sich unterschiedliche Methylierungsmuster in *met1*-Mutanten und *met1*-Hybriden auch mit dem Ort der Mutation erklären. Positionsabhängige Veränderungen der Aminosäuresequenz könnten sich unterschiedlich auf Proteinstruktur und Interaktionspartner auswirken was schließlich in nicht einheitlicher Methylierung der Cytosin-Motive resultiert. In der Literatur sind nur vereinzelt Veränderungen in Gen- sowie Proteinsequenz genannt (Kankel *et al.* 2003) und eine 3D Struktur ist noch nicht

veröffentlicht, so dass Rückschlüsse auf Veränderungen in der Proteinstruktur und ihre Auswirkung auf Interaktionspartner nicht gemacht werden können.

Man kann MET1 natürlich nicht isoliert von anderen Faktoren betrachten. MET1-vermittelte CpG-Methylierung löst eine Kaskade aus, die über H3K9-Dimethylierung zur CMT3-vermittelten CpNpG-Methylierung führt (Mathieu *et al.* 2005). Deshalb schlagen Lippman *et al.* (2003) vor, daß MET1, DDM1, sowie die Histon-Deacetylase SIL1 (ein HDA6 Allel) einen Komplex bilden. Ein Anhaltspunkt für einen solchen Komplex ist der humane NORC-Komplex, bestehend aus SNF2H, DNMT1, HDAC1 sowie dem *transcription termination factor1 interacting protein 5* (TIP-5; Santoro *et al.* 2002, Lippman *et al.* 2003). Auch Rountree *et al.* (2000) schlagen dies bezüglich bei Säugern einen Komplex aus DNA-Methyltransferase und Histon-Deacetylase vor. Die Histon-Methyltransferase KRYPTONITE (KYP, SUVH4) sowie ARGONAUTE (AGO) sind ebenfalls Kandidaten für einen putativen KRYPTONITE/ARGONAUTE-Komplex (KYP/AGO-Komplex) (Lippman *et al.* 2003). Dabei stellt H3K9 ein Bindeglied zwischen beiden putativen Komplexen dar (Lippman *et al.* 2003). KYP-vermittelte H3K9-Methylierung erfolgt nach vorangegangener SIL-vermittelter Deacetylierung. (Lippman *et al.* 2003). H3mK9 beeinflusst wiederum über die CpNpG-/CpNpN-Methyltransferase CMT3 die DNA-Methylierung (Lippman *et al.* 2003).

Mutationen in den Genen der hier wechselwirkenden Proteine haben gezeigt, daß nicht alle diese Faktoren gleichen Einfluß ausüben, sondern teilweise sehr spezifisch wirken und in anderen Fällen wiederum nicht erforderlich sind. So kann z. B. der DDM1/MET1/SIL1-Komplex *silencing* ohne KYP aufrechterhalten, während KYP in Abwesenheit von MET1, DDM1 oder SIL1 dazu nicht in der Lage ist (Lippman *et al.* 2003). Das zeigt, daß DDM1 und MET1 Histon-Modifikationen eher über SIL1, als über KYP beeinflussen (Lippman *et al.* 2003). Naumann *et al.* (2005) haben gezeigt, daß MET1 und DDM1 SUVH2-abhängiges *transgene silencing* dominieren, was ebenfalls die Möglichkeit eines Komplexes nicht ausschließt.

Die beste Möglichkeit einen Komplex nachzuweisen ist jedoch eine chromatographische Aufreinigung unterstützt von einer Immunopräzipitation (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit erworbenen Ergebnisse lassen jedoch solche Schlußfolgerungen nicht zu. Hier konnten keine phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *ddm1* und *met1* Mutanten beobachtet werden, die, nach Lippman *et al.* (2003), ein Indiz für einen Komplex sein könnten. Daß MET1, im Gegensatz zu DDM1, bereits im haploiden Gametophyt aktiv ist (Kankel *et al.* 2003) scheint ebenfalls gegen einen solchen Komplex zu sprechen. Auch die nahezu gleichen

Methylierungsmuster der *met1*- und *ddm1*-Null-Mutanten lassen keine Schlußfolgerung darüber zu, ob DDM1 *upstream* von MET1 agiert, was eine weniger deutlich ausfallende Hypomethylierung in *met1*, basierend auf der Aktivität anderer Methyltransferasen, aussagen könnte.

4.2 CMT3-vermittelte Regulation der Genexpression

Bei vielen Eukaryoten ist Cytosin-Methylierung bedeutsam für Genom-Stabilität und Entwicklung und äußert sich in der Änderung der Chromatinstruktur und Genexpression. *Gene silencing* bei Eukaryoten steht im Zusammenhang mit der Ausbildung von Heterochromatin, das durch DNA-Cytosin-Methylierung charakterisiert ist (Bartee *et al.* 2001). Während im Säuger-Genom hauptsächlich symmetrische Cytosin-Methylierung (CpG) stattfindet kommt im Pflanzen- und Pilzgenomen sowohl CpG- als auch nicht-CpG-Methylierung (CpNpG- und CpNpN-Methylierung) vor (Yoder *et al.* 1997, Colot und Rossignol 1999, Finnegan und Kovac 2000).

Die Mutante *cmt3-h1* repräsentiert einen Mutanten-Typ, bei dem hauptsächlich die CpNpG-Methylierung reduziert wird. Die Punktmutation in der *CHROMOMETHYLASE3* (*CMT3*) in Position 4302 der ungespleißten Nukleotidsequenz von Cytosin (C) nach Thymin (T) verursachte in Position 715 der Aminosäuresequenz eine Substitution von Prolin (Pro, P) durch Leucin (Leu, L). Diese Veränderung in der katalytischen DNA-Methyltransferase-Region wirkt sich maßgeblich auf die CpNpG-Methylierung aus und äußert sich in einem veränderten Blattphänotyp, größeren Habitus und beschleunigten Entwicklungsprozessen. Mit den dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnissen der *Southern*-Analyse konnte gezeigt werden, daß in der *cmt3*-Mutante *cmt3-h1* die CpNpG-Methylierung reduziert wurde, die CpG-Methylierung jedoch unbeeinträchtigt blieb. Bartee *et al.* (2001) konnten mittels *Southern*-Analyse und Bisulfitsequenzierung zeigen, daß *cmt3*-Veränderungen einen starken Verlust der nicht-CpG-Methylierung (sowohl CpNpG- als auch asymmetrische Cytosin-Methylierung) nach sich ziehen, aber auch einen teilweisen Verlust der CpG-Methylierung verursachen.

Im Vergleich zum *Arabidopsis thaliana* Wildtyp *Columbia* unterscheidet sich die *cmt3*-Mutante *cmt3-h1* durch einen deutlichen morphologischen Phänotyp. Diese Pflanzen sind durch große hellgrüne Blätter, schnelleres Wachstum und einen größeren Habitus charakterisiert. Der Phänotyp konnte jedoch in der F₂-Generation der *cmt3-h1/Ler*-

Hybriden nicht mehr beobachtet werden. In der Literatur wurden bisher keine morphologischen Veränderungen bei *cmt3*-Mutanten beschrieben. Bartee *et al.* (2001) führen an, daß im Gegensatz zu Mutationen, die eine allgemeine Verminderung der Methylierung bewirken (Finnegan *et al.* 1996; Kakutani *et al.* 1996; Ronemus *et al.* 1996), *cmt3*-Mutationen nicht zu pleiotropen Effekten nach Selbstung führen. Auch bei Cao und Jacobsen (2002b) sowie Lindroth *et al.* (2001) wurde kein morphologischer Phänotyp in *cmt3*-Mutanten beschrieben. Cao und Jacobsen (2002b) begründen dies damit, daß in *cmt3*-Mutanten andere Einflußgrößen des Pflanzenwachstums und der Pflanzenentwicklung beeinträchtigt werden als in *ddm1*- und *met1*-Mutanten.

Die Ursache für die morphologischen Abweichungen vom Wildtyp *Columbia* bei der Mutante *cmt3-h1* scheinen durch das Fehlen der nicht-CpG-Methylierung verursacht worden zu sein. Diese Art der Methylierung ist wichtig für endogene Prozesse (Cao und Jacobsen 2002b). In Pflanzen wird ein hohes Maß an nicht-CpG-Methylierung mit RNA-vermittelter DNA-Methylierung in Verbindung gebracht, die bei TGS und PTGS beobachtet wird und zur Inaktivierung von viralen und transposablen Sequenzen beiträgt (Pelissier *et al.* 1999, Wassenegger *et al.* 1994, Jones *et al.* 1998, Mette *et al.* 1999, Mette *et al.* 2000, Wassenegger 2000, Matzke *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001, Cao und Jacobsen 2002b). Eine Möglichkeit für die Ausprägung des pleiotropen Phänotyps können daher Defekte in der Genomabwehr und im *gene silencing* sein (Cao and Jacobsen 2002b). In diesem Zusammenhang steht auch die Beteiligung der CHROMOMETHYLASE3 an der Abwehr von Viren, sowie der Kontrolle von Transposons und Retrotransposons durch Methylierung. (Lindroth *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002, Johnson *et al.* 2002b, Tompa *et al.* 2002, Malagnac *et al.* 2002, Cao and Jacobsen 2002b, Tariq *et al.* 2003, Lippman *et al.* 2003). Eine Abnahme in der CpNpG-DNA-Methylierung, wie dies bei *cmt3*-Mutanten der Fall ist, führt zu einer Reaktivierung der Expression von Transposons (Lindroth *et al.* 2001). Kato *et al.* (2003) machen zwar CMT3 für das *silencing* von CACTA Transposons verantwortlich, doch für die Immobilität dieser Transposons sind MET1, CMT3 sowie DDM1 gemeinsam verantwortlich. CMT3 scheint bevorzugt transposon-verwandte Sequenzen zu methylieren (Tompa *et al.* 2002, Kato *et al.* 2003), so daß man annehmen könnte, daß CMT3-vermittelte nicht-CpG-Methylierung den sehr spezifischen evolutionären Zweck erfüllt Transposonkontrolle zu unterstützen (Kato *et al.* 2003). Obwohl Chromomethylasen ausschließlich im Pflanzenreich vorkommen, ist nicht-CpG-Methylierung mehr mit universellen epigenetischen Prozessen, wie RNA-Interferenz

und Histon-Methylierung verbunden, die zur Transposonkontrolle beitragen können (Kato *et al.* 2003).

4.3 Auswirkungen der DDM1-Insuffizienz auf Phänotyp und DNA-Interaktion

DDM1-Insuffizienz führt nicht immer zu morphologischen Veränderungen

Eine Deregulierung der Cytosin-Methylierung macht sich im Phänotyp von Säugern, Pilzen und Pflanzen durch eine Reihe von Entwicklungsdefekten bemerkbar (Jeddeloh *et al.* 1999). Bei *Arabidopsis thaliana* geht ein Methylierungsverlust mit dem Verlust der Apikaldominanz, einen kleineren Habitus, unterschiedlicher Blattform und –größe, einer abnehmenden Fertilität sowie einer zeitlich abweichenden Blüteninduktion und homöotischen wie ektopischen Veränderungen der Blütenorgane einher (Finnegan *et al.* 1996). In *ddm1*-Mutanten kommt es nach mehreren Generationen der Selbstung zu morphologischen Veränderungen (Kakutani *et al.* 1995, Finnegan *et al.* 1996, Richards 1997, Furner *et al.* 1998, Ruiz-García *et al.* 2005). Diese Pflanzen sind durch abgerundete Rosettenblätter, eine zunehmende Beblätterung der Infloreszenz, sowie einen spät blühenden Phänotyp charakterisiert (Kakutani *et al.* 1995, Finnegan *et al.* 1996, Richards 1997, Furner *et al.* 1998, Ruiz-García *et al.* 2005).

Im Gegensatz zu diesen Angaben wurden bei den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* keine morphologischen Veränderungen beobachtet. Nur die Mutante *ddm1-h3* ähnelt dem *ddm1*-Mutantenphänotyp. Bei dieser Mutante wurden breite, gewellte und in sich gedrehte Blätter, ein Verlust der Apikaldominanz, mehrere Blattrosetten und eine kurze Infloreszenz festgestellt. Nach Rückkreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* wurden in der F₂-Generation der *ddm1/Ler*-Hybriden keine phänotypischen Defekte beobachtet.

Alle in der vorliegenden Arbeit analysierten *ddm1*-Mutanten weisen eine starke Hypomethylierung sowohl im CpG- als auch im CpNpG-Motiv auf. Dies deckt sich mit der bereits bekannten Beobachtung, daß *ddm1*-Mutationen in *Arabidopsis thaliana* genomweit eine bis zu 70%ige Demethylierung (Ruiz-García *et al.*, 2005, Jeddeloh *et al.* 1999, Kakutani *et al.* 1995, Vongs *et al.* 1993) im CpG- und im CpNpG-Motiv verursachen (Finnegan *et al.* 1996, Johnson *et al.* 2002b, Mittelsten Scheid *et al.* 2002, Brzeski und Jerzmanowski 2003), was eine deregulierte Genexpression und erhöhte

Transposonaktivität nach sich zieht (Hirochika *et al.* 2000, Miura *et al.* 2001, Lippman *et al.* 2003, Lippman *et al.* 2004). Während die DNA-Hypomethylierung in *ddm1*-Mutanten besonders an repetitiven Sequenzen auftritt, ist sie an *low* bzw. *single copy* Sequenzen weniger stark ausgeprägt und macht sich erst allmählich bzw. graduell nach Selbstung in den nachfolgenden Generationen bemerkbar (Kankel *et al.* 2003, Verbsky und Richards 2001, Jeddelloh *et al.* 1999, Vongs *et al.* 1993, Kakutani *et al.* 1996).

Nach Rückkreuzung der *ddm1*-Mutanten mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta* wurde in der F₂-Hybrid-Generation keine oder nur geringe Remethylierung hypomethylierter Sequenzen erwartet. Literaturangaben zufolge bleibt DNA-Hypomethylierung auch nach Rückkreuzung der *ddm1*-Mutanten mit dem Wildtyp stabil (Vongs *et al.* 1993, Kakutani *et al.* 1999, Soppe *et al.* 2002, Brzeski und Jerzmanowski 2004). Im Gegensatz dazu konnte bei den in dieser Arbeit verwendeten *ddm1*-Mutante - zumindest den *LUCIFERASE-Locus* betreffend - keine stabile Vererbung der Hypomethylierung, nach Rückkreuzung mit dem Wildtyp, beobachtet werden. Eine stabile Weitergabe der Hypomethylierung liegt wahrscheinlich daran, daß DNA-Methylierung ein semikonservativer Prozeß ist, bei dem Remethylierung nicht mehr möglich ist (Brzeski und Jerzmanowski 2004). Dies impliziert, daß DNA-Methylierung ein langsamer Prozeß ist, obwohl bekannt ist, daß nach Transgeninduktion epigenetisches *silencing* umgehend einsetzt (Brzeski und Jerzmanowski 2004). Da die hier diskutierten *ddm1*-Mutanten ein Transgenkonstrukt enthalten liegt es nahe, die Remethylierung mit transgeninduzierten epigenetischen *silencing* in Verbindung zu bringen.

In allen drei *ddm1*-Mutanten konnte eine deutliche Transgenreaktivierung festgestellt werden. Während in den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* nur bezüglich des Mutationsortes homozygote F₂-Hybride starke Transgenreaktivierung aufweisen, ist bei der Mutante *ddm1-h3* die Transgenreaktivierung auch in den heterozygoten Pflanzen vorhanden.

Diese dominant negative Ausprägung der *ddm1*-Mutation in den *ddm1-h3/Ler*-F₂-Hybriden machte es notwendig, die Kartierungspopulation mit der *Southern*-Analyse zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde eine Restriktion mit der methylierungssensitiven Endonuklease *HpaII* durchgeführt. Lediglich homozygote F₂-Hybride zeigten eine Hypomethylierung im CpG-Motiv.

Mit der RT-PCR-Analyse konnte schließlich gezeigt werden, daß die DDM1 mRNA-Synthese bei den Mutanten *ddm1-h2* und *ddm1-h1* sehr deutlich beeinträchtigt ist. Während die Mutante *ddm1-h3* ein ebenso starkes Transkript wie der Wildtyp aufweist.

Während bei der Mutante *ddm1-h2* fehlerhaftes Spleißen und bei der Mutante *ddm1-h1* ein vorzeitiges Stop-Codon für einen raschen Abbau der insuffizienten Genprodukte sorgen, wird in der Mutante *ddm1-h3* möglicherweise ein Protein synthetisiert, welches in seiner Interaktionsfähigkeit weitgehend eingeschränkt ist. Die Sequenzanalyse ergab für die Mutante *ddm1-h3* eine Punktmutation am Exon/Intron-Übergang in Position 3126 der ungespleißten Nukleotidsequenz von Guanin (g) nach Adenin (a). Diese Nukleotidsubstitution verursacht fehlerhaftes Spleißen und führt zu einem Abbruch der Wildtyp-Aminosäuresequenz nach Position 622. Zusätzlich werden 26 Aminosäuren aus der translatierten Intronsequenz angehängt, bis die Translation durch ein Translationsstoppsignal im Intron terminiert wird. Dadurch entsteht ein um das Motiv VI verkürztes DDM1 Protein.

Die Mutante *ddm1-h3* – eine dominant negative *ddm1*-Mutante

Proteine aus der SWI2/SNF2-Familie sind bei Pflanzen, Pilzen und Säugern hauptsächlich in der N-terminalen SNF2-Domäne und der C-terminalen Helicase-Domäne in sieben Helicase-Motiven, die das katalytische Modul bilden, stark konserviert (Eisen *et al.* 1995, Richmond und Peterson 1996, Smith and Peterson 2005, Brzeski und Jerzmanowski, 2003). Dabei zeigen die Mitglieder der SWI2/SNF2-Familie keine DNA-Helicase-Aktivität, sondern wirken als DNA stimulierte ATPasen (Coe *et al.* 1994, Smith und Peterson 2005). Sie binden ATP-unabhängig und dissoziieren in einem ATP-abhängigen Prozeß von ihrer Bindungsstelle (Vignali *et al.* 2000). Die ATPase-Domäne ist aus zwei Subdomänen aufgebaut (Smith und Peterson 2005). Einer konservierten N-terminalen Subdomäne I mit den Motiven I, Ia, II und III, die für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse erforderlich sind und der C-terminalen konservierten Subdomäne II mit den Motiven IV, V und VI, die eine Rolle bei der Energieübertragung spielen (Hall und Matson 1999, Caruthers und McKay 2002, Smith und Peterson 2005). Bisher wurde nachgewiesen, daß ein Aminosäureaustausch im Motiv I (Walker A Box) die ATPase-Aktivität *in vitro* eliminiert und zu einem Null-Phänotyp führt (Laurent *et al.* 1993, Richmond und Peterson 1996, Smith und Peterson 2005). Smith und Peterson (2005) konnten für *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, daß sich Veränderungen im Motiv V negativ auf die Remodellingaktivität auswirken, aber keinen Einfluß auf die ATP Hydrolyse haben. Dennoch entsprach der Phänotyp einer Nullmutante. Ein Aminosäureaustausch in den Motiven IVb und VI führt zu einer

starken Reduzierung der ATP Hydrolyse und zu starken Defekten *in vivo*, wobei beim Aminosäureaustausch im Motiv VI eine stärkere ATP-Bindung beobachtet wurde (Anstieg der K_m). Ein einzelner Aminosäureaustausch im Motiv III führte zu einem intermediären Phänotyp sowie einer mittleren ATP-Hydrolyserate *in vitro* (Smith und Peterson 2005). Für die anderen Motive wurden Veränderungen in ATP-Bindung und Hydrolyse bekannt (Smith und Peterson 2005).

Es ist hinreichend in der Literatur belegt, das sich Mutationen in SWI2/SNF2-ATPasen dominant negativ auswirken, wie Lee *et al.* (2000) für PASG (*proliferation associated SNF2-like gene product*) und Richmond und Peterson (1996) für die Hefe-SWI2/SNF2-Helicase/ATPase belegen konnten. Yano *et al.* (2004), konnten beim NSCLC (*non-small cell lung cancer*) ein gegenüber dem normalen HELLS/SMARCA6-Protein (*helicase lymphoid-specific/SWI/SNF2-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A*) vorzeitig terminiertes dominant negatives Polypeptid nachweisen. Deuring *et al.* (2000) haben für das *Drosophila* ISWI (*imitation switch*) zeigen können, daß dominant negative Mutationen die Struktur des männlichen X-Chromosoms verändern.

An dieser Stelle können zwei Erklärungsversuche für das dominant negative Verhalten der Transgenreaktivierung in der Mutante *ddm1-h3* unternommen werden. Intaktes und mutiertes DDM1 könnten ein Dimer bilden, das eingeschränkt funktionsfähig ist oder das mutierte DDM1 tritt in Konkurrenz zum funktionsfähigen Protein und verhindert dadurch die Interaktion mit seiner Bindungsstelle.

SWI2/SNF2-ATPasen können als Monomer oder als Dimer vorliegen. Szerlong *et al.* (2003) diskutieren für Hefe, daß *nuclear actin-related proteins* (ARPs) essentielle Komponenten von Chromatin-Remodelling- und chromatin-modifizierenden Komplexen sind und für die Dimerisierung des Hefe SWI/SNF-Komplexes und des RSC-Komplexes (*remodels the structure of chromatin*) verantwortlich sind. Beerens *et al.* (2005) beschreiben im diesen Zusammenhang das CSB-Protein (*cockayne syndrome group B protein*) aus der Familie der SWI2/SNF2-Chromatin-Remodelling-ATPasen. CSB übernimmt eine essentielle Rolle bei der transkriptionsgekoppelten DNA-Reparatur und bindet als Homodimer an die DNA (Beerens *et al.* 2005). Es ist demnach möglich, daß DDM1 ein Homodimer bildet (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Bisher ist jedoch nicht bekannt, daß DDM1 als Homodimer vorliegt. Um dies bezüglich Gewißheit zu erlangen sollte eine Immunopräzipitation durchgeführt werden sowie eine entsprechende Transformation von *Arabidopsis* mit zwei verschiedenen DDM1-Reportergen-Konstrukten um das Verhalten *in vivo* zu dokumentieren.

Der zweite Erklärungsversuch sieht vor, daß sich das modifizierte Protein in Konkurrenz zum nicht modifizierten DDM1 an die nukleosomale DNA anlagert ohne jedoch seine Funktion erfüllen zu können (Richmond und Peterson 1996, Smith und Peterson 2005, Brzeski und Jerzmanowski 2003). Das würde auch die nicht so deutlich ausfallende Hypomethylierung in heterozygoten Pflanzen erklären. Da die Helicase-Domäne von der Mutation betroffen ist, erscheint diese Erklärung wahrscheinlich, denn die ATP-Hydrolyse ist für die Histon-Verlagerung notwendig und es wird davon ausgegangen, daß die an die Helicase-Domäne gebundene ATP-Hydrolyse die Bindung zwischen DNA und Histon löst (Raabe *et al.* 2001). So kann im Zusammenhang mit der dominant negativen Mutante *ddm1-h3* auch eine nicht reversible Bindung an die nukleosomale Bindungsstelle diskutiert werden, da eine reversible Bindung energieabhängig ist.

Alexiadis *et al.* (2004) beschreiben eine N-terminale Deletion in dem *Drosophila* SWI2/SNF2-Chromatin-Remodelling-Faktor Rad54, die sich auf die Remodellingaktivität des Enzyms auswirkt, jedoch keinen Einfluß auf die ATPase-Aktivität hat. Lee *et al.* (2000) haben gezeigt, daß *SMARCA6* (*SWI/SNF2-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 6*) bei Leukämie eine 75 Nukleotide große Deletion im konservierten Motiv V der Helicase-Domäne aufweist. Diese Deletion äußert sich in einem 25 Aminosäuren kürzeren PASG und bewirkt ebenfalls eine dominant negative Mutation. PASG weist hohe Sequenz- und Funktionshomologie zu DDM1 und SNF2L (*SUCROSE NON-FRMENTING2-like*), dem humanen Homologen zum *Drosophila* ISWI auf (Lee *et al.* 2000, Sun und Arceci 2005) und wirkt sich, wie DDM1 in der Mutante *ddm1-h3*, dominant negativ aus (Lee *et al.* 2000). PASG wird mit Proliferation, Chromatin-Remodelling sowie Cytosin-Methylierung und *gene silencing* in Verbindung gebracht (Lee *et al.* 2000, Raabe *et al.* 2001, Sun und Arceci 2005). Ein Funktionsverlust bewirkt, wie bei DDM1, einen genomweiten Verlust der Methylierung sowie eine Reexpression vormals inaktiver Gene (Sun und Arceci 2005).

Richmond und Peterson (1996) konnten für eine Hefe SWI2/SNF2-ATPase zeigen, daß Veränderungen in den Helicase-Motiven IV, V und VI zu dominant negativen Phänotypen führen. Diese Beobachtung konnte ebenfalls von Lee *et al.* (2000) für das Motiv V in PSAG gemacht werden. Die angeführten Literaturangaben stehen im Einklang mit der Mutante *ddm1-h3*, deren DDM1 Protein um das Motiv VI verkürzt ist (Abbruch der Aminosäuresequenz nach Position 622).

Der Hefe SWI/SNF-Komplex, der eine Substitution im Motiv VI enthält zeigt zwar DNA-unabhängige ATPase Aktivität, wird aber nicht mehr länger von DNA stimuliert (Craig Peterson, persönliche Mitteilung). Das Motiv VI ist ein Schlüssel für die direkte Interaktion mit DNA (Craig Peterson, persönliche Mitteilung). DDM1-H3 scheint deshalb dominant negativ zu sein, weil es zwar mit dem Nukleosom interagiert, aber nicht mehr ATP hydrolysiert (Craig Peterson, persönliche Mitteilung). DDM1-H3 kann also nicht mehr dissoziieren und blockiert die Bindungsstelle für das aktive Enzym (Craig Peterson, persönliche Mitteilung).

Auch über eine gestörte Interaktion zwischen DDM1-H3 und einen möglichen Kofaktor sollte an dieser Stelle nachgedacht werden. Die Hefe RNA-Helicase eIF4A, enthält eine zum Hefe SWI2 Motiv VI sehr ähnliche Sequenz, die vermutlich bei der Bindung des RNA-Kofaktors beteiligt ist (Richmond und Peterson 1996). Auch bei DDM1 könnte man über die Beteiligung eines Kofaktors nachdenken. DDM1 zeigt im *in vitro sliding assay* sehr langsame Remodellingaktivität obwohl es angemessene ATPase Aktivität zeigt (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Deshalb scheint es möglich, daß DDM1 weitere Untereinheiten benötigt um seine volle Leistungsfähigkeit entfalten zu können (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Dies trifft für ISWI innerhalb der ACF- und CHRAC-Komplexe bei *Drosophila* zu (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Die ACF1-Untereinheit bindet an ISWI und verbindet die ATP-Hydrolyse mit der *sliding* Aktivität (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). ACF1-gebundenes ISWI ist wesentlich effizienter, denn es gleitet über mehr Nukleosomen pro hydrolysierte *unit* ATP-Moleküle (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). ACF1 bildet eine zusätzliche Nukleosom-Interaktionsoberfläche, die für die Reaktion wichtig ist (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Außerdem können weitere Faktoren für die effiziente Bindung von DDM1 an das Nukleosom erforderlich sein (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Es ist also möglich, daß DDM1 ein spezifisches Substrat bevorzugt (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung). Außerdem ist DDM1 nur ein schwacher Nukleosomen *slider* (Jan Brzeski, persönliche Mitteilung).

Im Allgemeinen läßt sich sagen, daß das Fehlen, eines so wichtigen Elementes wie eines Helicase-Motivs, das Enzym funktionsunfähig macht, weil es nicht korrekt faltet (Andrew Flaus, persönliche Mitteilung). Wenn das Enzym innerhalb eines Komplexes wirkt, so kommt es zu einer nichtkompetitiven Hemmung (Andrew Flaus, persönliche Mitteilung). Eine andere Möglichkeit ist, daß das Enzym das Substrat bindet und kompetitiv das intakte Enzym blockiert, oder als kompetitiver Inhibitor in das

regulatorische System, das das intakte Enzym kontrolliert, eingreift (Andrew Flaus, persönliche Mitteilung).

In Anlehnung an die hier diskutierte Literatur sowie meine Korrespondenz mit Jan Brzeski, Andrew Flaus und Craig L. Peterson schlage ich ein Modell vor, in dem das Motiv VI sowohl für die Bindung eines Kofaktors als auch für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist. In *ddm1-h3*-Mutanten bindet DDM1-H3 irreversibel an seinen nukleosomalen Bindungsort und kann in Abwesenheit des Motivs VI wie des Kofaktors weder Energie für seine Dissoziation noch für die Chromatin-Remodellierung weiterleiten. So wird eine Interaktion mit aktivem DDM1 an dieser Bindungsstelle blockiert.

Bisher wurde keine Funktionsanalyse der Helicasemotive bei DDM1 durchgeführt. Deshalb ist es dringend erforderlich gezielte Deletionsanalysen durchzuführen um ein eingehendes Verständnis über die Bedeutung der Helicasemotive bei der ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierung zu erlangen.

4.4 Die Mutante *rnrl-h1* – TGS-Suppression ohne Methylierungsverlust

Die Mutante *rnrl-h1* vertritt einen Mutantentyp, bei dem TGS, jedoch nicht DNA-Methylierung, beeinträchtigt ist. Weitere Vertreter dieses Typs sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mutante 12/1/7, sowie die in *Arabidopsis* identifizierten TGS-Suppressormutanten *mom1* (Amedeo *et al.* 2000), *bru1* (Takeda *et al.* 2004) und *ttg2* (Hofmann 2004). Ebenso wie bei den Mutanten *rnrl-h1* und 12/1/7 bewirkt die Mutation bei den Mutanten *bru1* (Takeda *et al.* 2004) und *ttg2* (Johnson *et al.* 2002a, Hofmann 2004) morphologische Veränderungen. Dagegen weist die *mom1*-Mutante (Amedeo *et al.* 2000, Mittelsten Scheid *et al.* 2002) keinen morphologischen Phänotyp auf.

Die Mutante *rnrl-h1* besitzt einen charakteristischen morphologischen Phänotyp, der vor allem durch bleiche Primärblätter hervorsteht. Die Primär- sowie auch die Folgeblätter nehmen im Verlauf ihrer Entwicklung eine gelbgrüne Färbung mit unregelmäßiger Panaschierung an. Eingehende Untersuchungen haben gezeigt, daß der TGS-Suppressorphänotyp mit dem morphologischen Phänotyp kosegregiert. In der F₂-Population wurde eine signifikante Transgenreaktivierung ausschließlich bei Pflanzen beobachtet, die sowohl den Blattphänotyp aufweisen, als auch homozygot bezüglich des Mutationsortes sind.

Die Kartierung des putativen Mutationsortes ergab eine Kopplung auf Chromosom 2. Dabei konnte der Mutationsort zwischen 9245744 bp und 9378556 bp eingegrenzt werden. Mit Hilfe von Datenbanken wurden die im eingegrenzten Bereich annotierten *Loci* auf eine mögliche Relevanz für TGS überprüft. Dabei erwiesen sich 9 *Loci* auf BAC F7D8 auf Grund ihrer Annotierungsdaten als putative Kandidatengene. Die *Loci* At2g21710 (*mitochondrial transcription termination factor-related/mTERF-related*), At2g21790 (große Untereinheit der Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase), At2g21810 (Zinkfingerprotein), At2g21830 (DC1-Domänen-Protein), At2g21840 (Zinkfingerprotein), At2g21850 (DC1-Domänen-Protein), At2g21900 (WRKY-DNA-Bindeprotein), At2g21930 (F-Box Protein) und At2g21950 (*SKP1 interacting partner*) wurden aufgrund ihrer Bedeutung für Transkription, DNA-Bindung und Synthese sowie Proteolyse, Proteininteraktion und Proteinbiosynthese für weitere Untersuchungen mittels RT-PCR und Sequenzanalyse ausgewählt. Dabei wurde für den *Locus* At2g21790 in der RT-PCR-Analyse eine Reduzierung der Transkriptmenge gefunden. Die Sequenzanalyse ergab für diesen *Locus* eine Punktmutation in Position 3798 der DNA-Sequenz. Infolge der EMS-Mutagenese wurde hier die Base Guanin (G) durch Adenin (A) ersetzt. Diese G nach A Transition ist ein charakteristischer Effekt der EMS-Mutagenese (Krieg 1963). Dadurch wurde in Position 763 der Aminosäuresequenz Alanin (A, Ala) durch Threonin (T, Thr) substituiert. Die reduzierte Transkriptmenge in der RT-PCR-Analyse ließ darauf schließen, daß es sich hier um eine *nonsense* Mutation handeln könnte. Bei der gefundenen Mutation handelt es sich jedoch um eine *missense* Mutation, in deren Folge kein mRNA-Abbau über *nonsense mediated decay* (NMD) zu erwarten ist. Die gefundene Mutation erklärt somit nicht die verringerte Transkriptmenge. Mögliche Ursachen sind, daß bei der Translation eines nicht oder nur eingeschränkt funktionsfähigen Proteins ein erhöhter Abbau der mutierten mRNA stattfindet bzw. die betroffene mRNA aufgrund einer Instabilität infolge der Mutation einem erhöhten Abbau unterliegt (Bost und Cribbs 1969).

Um den Zusammenhang zwischen dem mutierten *Locus* und der Transgenreaktivierung sowie dem morphologischen Phänotyp nachzuweisen wurde eine Komplementation mit dem Wildtyp-Allel des *Locus* At2g21790 durchgeführt. Die so generierten Pflanzen zeigten keine *LUCIFERASE*-Aktivität. Auch der charakteristische Mutantenphänotyp konnte nicht mehr beobachtet werden. Alle komplementierten Pflanzen zeigten wieder den Wildtypphänotyp. Anhand dieser Ergebnisse konnte bewiesen werden, daß es sich bei der Mutante *rnr1-h1* um eine neue TGS-Suppressormutante handelt. Die Mutation

im *Locus* At2g21790 hat keine Auswirkung auf die DNA-Methylierung, wirkt sich aber trotzdem regulatorisch auf die Transgenreaktivierung aus.

Hier konnte zum ersten Mal bei *Arabidopsis thaliana* eine Mutation in der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR1) mit *transcriptional gene silencing* (TGS) in Verbindung gebracht werden. Außerdem stellt die Mutante *rnr1-h1* die erste beschriebene *Arabidopsis*-Mutante für den *Locus* At2g21790 dar.

Die Ribonukleotid-Reduktase (RNR) katalysiert die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und stellt somit Bausteine für die DNA-Synthese und DNA-Reparatur bereit (Sauge-Merle *et al.* 1999, Kolberg *et al.* 2004, Lincker *et al.* 2004). Die transkriptionelle Induktion der *RNR*-Gene erfolgt am G1/S-Übergang des Zellzyklus (Chaboute *et al.* 1998). Die RNR-Aktivität fluktuiert im Verlauf des Zellzyklus und zeigt ein Maximum während der S-Phase (Chaboute *et al.* 1998). Eine gestörte RNR-Funktion kann deshalb zu genetischen Abnormalitäten führen (Lincker *et al.* 2004). Eine defekte Ribonukleotid-Reduktase wirkt sich auf den Zellzyklus sowie das Wachstum aus und führt zur p53-abhängigen Apoptose (Wang und Liu 2006). Dagegen verursacht eine unnatürliche Zunahmen der RNR-Aktivität eine erhöhte Mutationsrate (Wang und Liu 2006). Die RNR bildet außerdem einen Angriffspunkt in der Krebstherapie (Tsimberidou *et al.* 2002, Radivoyevich *et al.* 2005) sowie HIV-Therapie (Lori *et al.* 1994, Mayhew *et al.* 1999, Mayhew *et al.* 2002a, Mayhew *et al.* 2002b, Mayhew *et al.* 2005). Eine zunehmende RNR-Aktivität wurde mit maligner Transformation und Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Tsimberidou *et al.* 2002). Der therapeutische Ansatz sieht deshalb den Einsatz von RNR-Inhibitoren vor (Tsimberidou *et al.* 2002). Auch die Vermehrung von Retroviren kann durch den Einsatz von RNR-Inhibitoren eingeschränkt werden (Lori *et al.* 1994, Mayhew *et al.* 1999, Mayhew *et al.* 2002a, Mayhew *et al.* 2002b, Mayhew *et al.* 2005).

Arabidopsis-RNR gehört ebenso wie die Säuger- und *Escherichia coli*-RNR zur Klasse Ia der Ribonukleotid-Reduktasen (Sauge-Merle *et al.* 1999). RNR1a bildet ein Tetramer aus einer dimeren großen (R1₂, RNR1₂) sowie einer dimeren kleinen Untereinheit (R2₂, RNR2₂) (Sauge-Merle *et al.* 1999, Kolberg *et al.* 2004). Radivoyevich *et al.* (2005) konnten zeigen, daß die Untereinheiten sowohl als Tetramer (R1₄R2₄), als auch als Hexamer (R1₆R2₆) vorliegen können. Dabei stellt R1Ia die regulatorische Untereinheit dar, während R2Ia als katalytische Untereinheit dient (Laman *et al.* 1995). R1Ia bindet das Substrat und enthält in der Bindungsstelle das reduzierende aktive Cystein-Paar sowie ein weiteres Cystein (Sauge-Merle *et al.* 1999, Kolberg *et al.* 2004). Die *Arabidopsis*-R1-Aktivität wird durch Thioredoxin und ATP stimuliert und durch dATP

inhibiert (Sauge-Merle *et al.* 1999). R2Ia enthält ein Eisenzentrum aus zwei Eisen Ionen sowie das katalytische Tyrosylradikal, das dazu dient, ein katalytisch notwendiges Thiylradikal am dritten Cystein der R1Ia Substratbindungsstelle zu generieren (Philipps *et al.* 1995, Sauge-Merle *et al.* 1999, Kolberg *et al.* 2004). Chen *et al.* (2003) konnten zeigen, daß genotoxischer Streß eine erhöhte Expression von *Arabidopsis*-R2 bewirkt.

Sauge-Merle *et al.* (1999) haben eine molekulare Charakterisierung der große Untereinheit der *Arabidopsis thaliana* Ribonukleotid-Reduktase (R1) vorgenommen und 69% Homologie zum menschlichen und Maus-R1-Protein, 64% zum Hefe-R1-Protein sowie 30% zum *E. coli*-R1-Protein (Sauge-Merle *et al.* 1999) festgestellt. Während *Arabidopsis thaliana* nur einen *Locus* für die große Untereinheit besitzt [*The Arabidopsis Information Resource* (tair) (<http://www.arabidopsis.org/>)], verfügt *Nicotiana tabacum*, ebenso wie *Saccharomyces cerevisiae*, über zwei große Untereinheiten (RNR1 und RNR3) (Chaboute *et al.* 1998). Die *RNR1*-Expression wird dabei zellzyklusreguliert, während die *RNR3*-Expression ausschließlich bei DNA-Schädigung erfolgt (Elledge und Davis 1990, Chaboute *et al.* 1998).

Laman *et al.* (1995) haben zum ersten Mal die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (R1, RNR1) mit *mating-type gene silencing* bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* in Verbindung gebracht. Dabei konnten sie feststellen, daß Mutationen in *SDS* Genen (*sds*, *suppressor of defective silencing*) den *silencing* Defekt von *HMR* in *rap1 hmrΔA* Stämmen durch Verlängerung des Zellzyklus unterdrücken (Laman *et al.* 1995). Dieser Effekt konnte ebenfalls durch Hydroxyurea (HU), das die S-Phase des Zellzyklus verlängert, verursacht werden (Laman *et al.* 1995). HU wirkt auf die katalytische, also die kleine Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (R2, RNR2) (Laman *et al.* 1995) und inaktiviert dadurch die Ribonukleotid-Reduktase (RNR, RR) (Chaboute *et al.* 1998, Culligan *et al.* 2004). Das *SDS Gen SDS12* konnte als große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR1) identifiziert werden (Laman *et al.* 1995). Laman *et al.* (1995) konnte in *rap1 rnr1 hmrΔA* Mutanten ebenfalls eine verlängerte S-Phase des Zellzyklus beobachten. Laman *et al.* (1995) schlagen vor, daß während eines verlängerten Zellzyklus die Deletion des ARS-Elements (*autonomously replicating sequence*) durch alternative kryptische ARS-Elemente kompensiert wird. Möglicherweise können am Ende einer verlängerten S-Phase verstärkt spezifische *silencing* Faktoren wirken (Laman *et al.* 1995). Eine temporär oder durch Vergrößerung des Zellvolumens bedingte Milieu- oder Konzentrationsänderung im Nukleus könnte ebenfalls *silencing* fördern (Laman *et al.* 1995). Andererseits könnte auch eine späte Replikation an sich die Chromatinstruktur beeinflussen und *silencing* unterstützen

(Laman *et al.* 1995). Die Histon-Deacetylierung geschieht bevorzugt am Ende der S-Phase, so daß sich eine Verlängerung der S-Phase ebenfalls auf die Heterochromatinisierung auswirken könnte (Laman *et al.* 1995).

Michel *et al.* (2005) haben die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (R1, RNR1) mit *telomeric silencing* [*telomere position effect* (TPE)] bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* in Verbindung gebracht und in *rnr1*-Mutanten einen *silencing* bzw. TPE-Suppressorphänotyp beobachtet. Der *silencing* Suppressorphänotyp wurde ebenfalls durch den RNR-Inhibitor Hydroxyurea (HU) verursacht (Michel *et al.* 2005). Michel *et al.* (2005) konnten zeigen, daß in *rnr1*-Mutanten *silencing* wieder hergestellt wurde und machen dafür eine spontane Reduzierung der rDNA *repeats* des rDNA-Locus verantwortlich. Dieser Verlust an rDNA führt zu einer Erhöhung der Deacetylase-SIR2-Konzentration. SIR2 verursacht einerseits *mating-type gene silencing* sowie *telomeric silencing* und vermindert andererseits ihre eigene Expression und somit auch ihre Konzentration durch einen autoregulatorischen Effekt (Michel *et al.* 2005).

Es bleibt zu klären, ob eine temporäre Ausdehnung der S-Phase des Zellzyklus oder eine Beeinträchtigung des dNTP-Pools auf TGS wirkt. Laman *et al.* (1995) haben in *rap1 rnr1 hmrΔA* Mutanten bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Verstärkung bzw. Reetablierung von *mating-type gene silencing* beobachtet. Sie machen die Prozesse am Ende der S-Phase, die durch ihre Verlängerung verstärkt werden, dafür verantwortlich. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen haben Michel *et al.* (2005) in *rnr1*-Mutanten bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Reduzierung des *telomeric silencing* [*telomere position effect* (TPE)] festgestellt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen, die an der Mutante *rnr1-h1* gewonnenen wurden. Auch die Mutante *rnr1-h1* zeigt eine Aktivierung des vormals inaktiven Transgenkonstruktes.

Wang und Liu (2006) haben für alle drei *Arabidopsis thaliana* R2-Gene [*TSO2* (At3g27060), *RNR2A* (At3g23580) und *RNR2B* (At5g40942)] Mutanten isoliert und charakterisiert. Dabei konnten sie interessanter Weise in *tso2rnr2a*-Doppelmutanten ebenfalls eine Suppression von *transcriptional gene silencing* (TGS) beobachten.

Eine Aufzucht der Mutante auf dNTP-substituiertem Kulturmedium soll Aufschluß darüber verschaffen, ob der TGS-Suppressorphänotyp revidiert werden kann. Damit könnte gezeigt werden, daß die Ribonukleotid-Reduktase über den dNTP-Pool auf TGS Einfluß ausübt. Anderenfalls sollten Untersuchungen durchgeführt werden, ob die große Untereinheit, bzw. die RNR insgesamt neben ihrer enzymatischen Aktivität weitere Funktionen direkt am Chromatin erfüllt. Auf den Ergebnissen aufbauende

zytogenetische Untersuchungen an der Mutante *rnr1-h1* haben gezeigt, daß in dieser Mutante eine dramatische Veränderung der Architektur des Zellkerns zu beobachten ist (Dr. A. Fischer, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, 06120 Halle, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung ist möglicherweise ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung der RNR am Aufbau und an der Regulation der Chromatinstruktur, die nicht im unmittelbaren Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität des Proteins steht.

4.5 Die Mutante 12/1/7 – Mutation in der perizentrischen Region

Die Mutante 12/1/7 unterscheidet sich phänotypisch von der Ausgangslinie durch deutlich verlangsamtes Wachstum sowie schmale, gelb gefärbte und sehr dicht behaarte Blätter mit grünen Blattadern und stark gesägten Blattrand. Die Transgenreaktivierung ist mittelstark ausgeprägt. Das Methylierungsmuster zeigt im Vergleich zur Ausgangslinie keine Veränderungen. In der F₂-Population, nach Kreuzung mit dem *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Landsberg erecta*, ist eine Kosegregation von Transgenreaktivierung und morphologischen Phänotyp zu beobachten, so daß die Kartierungspopulation anhand des Phänotyps selektiert werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen eine Kopplung auf Chromosom 5 festzustellen. Eine Kartierung des Mutationsortes konnte jedoch nicht abgeschlossen werden, da sich der Mutationsort in der perizentrischen Region zwischen 10180644 bp und 13222572 bp befindet. Rekombination wird jedoch in der Nähe der Zentromere oft unterdrückt (Nachman 2002), so daß eine markergestützte Selektion des Mutationsortes in diesem Fall nicht möglich war. Die Zentromere von *Arabidopsis thaliana* enthalten eine 2,8 bis 4 Mb große Region in der 178 bp großen Satelliten *tandem repeats* bilden, die gelegentlich von *Athila*-Insertionen, einem Ty3/*gypsy*-Retroelement unterbrochen werden (Hall *et al.* 2004). Die mittlere repetitive Region, die die Satelliten flankiert enthält ebenfalls *Athila*- und andere Retroelemente sowie 5S ribosomale DNA (rDNA), transposable Elemente und Pseudogene (Hall *et al.* 2004). Trotz des heterochromatischen Umfelds enthält die mittlere repetitive Region, die einem zehntel der Chromosomenarme entspricht, mehr als 200 exprimierte Gene (Hall *et al.* 2004). Die hier charakterisierte Mutante scheint einen Mutationsort in einer Region zu beinhalten, für die bisher keine Gene nachgewiesen wurden, die einen direkten oder indirekten Einfluß auf *transcriptional gene silencing* ausüben könnten. Es wäre

möglich, daß es sich hier, wie beim *Morpheus Molekül 1* (MOM1), um ein Protein handeln könnte, das DNA-Methylierung in TGS übersetzt und *downstream* von DNA-Methylierung wirkt oder als Teil eines regulatorischen Mechanismus, unabhängig von DNA-Methylierung, agiert und somit einen anderen epigenetischen Kontrollfaktor zur Regulation der Genexpression darstellt (Mittelsten Scheid *et al.* 2002). So könnte hier, ebenfalls wie im Fall von *mom1*-Mutanten, trotz Hypermethylierung eines Zielgens, transkriptionelle Aktivität wieder hergestellt worden sein (Mittelsten Scheid *et al.* 2002). Aber im Gegensatz zu dem hier beobachteten Phänotyp resultieren Mutationen im *MOM1*-Gen nicht in morphologischen Veränderungen (Mittelsten Scheid *et al.* 2002). So kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Lokalisation des Mutationsortes nur über Recherche in der Annotierungsdatenbank und der Sequenzierung putativer Kandidatengene erfolgen.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer *transcriptional gene silencing* (TGS) Suppressormutanten in *Arabidopsis thaliana*. Zu diesem Zweck wurde das von Dr. I. Hofmann (2004) etablierte transgene *transcriptional gene silencing* Testsystem für *Arabidopsis thaliana* mit *LUCIFERASE* als transgenen Reporter verwendet. Mit diesem Testsystem konnten 9 Mutanten mit starker Transgenexpression charakterisiert werden. Dabei wurde bei 7 Mutanten eine deutliche Hypomethylierung der Reportergene nachgewiesen. Bei einer dieser Mutanten war ausschließlich im CpNpG-Motiv die DNA-Methylierung reduziert. Zwei der Mutanten zeigten keine Veränderung der DNA-Methylierung. Zum Teil konnte eine Kosegregation des *transcriptional gene silencing* Suppressorphänotyps und morphologischer Veränderungen beobachtet werden. Durch die Kartierung der Mutationsorte wurden insgesamt 4 verschiedene *Loci* identifiziert. Dabei handelte es sich um die drei bereits bekannten Modifikatoren für *transcriptional gene silencing* *CMT3*, *MET1* und *DDM1* sowie die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase. Bei einer Mutante konnte jedoch aufgrund der genomischen Lokalisation des Mutationsortes in der perizentrischen Region eine erfolgreiche Kartierung nicht abgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Auswirkung neuer Punktmutationen in bereits bekannten TGS-Modifikatoren sowie der zusätzlichen Funktion als TGS-Modifikatoren bereits charakterisierter *Loci*. Zum einen konnte bei *Arabidopsis thaliana* die große Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase mit *transcriptional gene silencing* in Verbindung gebracht werden. Eine Komplementation der Mutanten mit dem Wildtyp-Allel führte zum Verlust des *transcriptional gene silencing* Suppressorphänotyps sowie des morphologischen Phänotyps. Des Weiteren war es möglich eine dominant negative *ddm1*-Mutante zu identifizieren und zu charakterisieren.

6 Literaturverzeichnis

- Alexiadis V., Lusser A., Kadonaga J.T.: A conserved N-terminal motif in Rad54 is important for chromatin remodeling and homologous strand pairing. *J. Biol. Chem.* 279 (2004): 27824-27829.
- Allard, R. W.: Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24(1956): 235-278.
- Amedeo P., Habu Y., Afsar K., Scheid O.M., Paszkowski J.: Disruption of the plant gene *MOM* releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 405 (2000): 203-206.
- Aparicio O.M., Billington B.L., Gottschling D.E.: Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66 (1991): 1279-1287.
- Arnaud P., Feil R.: Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75 (2005): 81-97.
- Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F.: The gene for domains rearranged methyltransferase (DRM2) in *Arabidopsis thaliana* plants is methylated at both cytosine and adenine residues. *FEBS Lett.* 532 (2002): 367-372.
- Assaad F.F., Tucker K.L., Singer E.R.: Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993): 1067-1085.
- Aufsatz W., Mette M.F., Matzke A.J., Matzke M.: The role of MET1 in RNA-directed *de novo* and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol. Biol.* 54 (2004): 793-804.
- Autran D., Huanca-Mamani W., Vielle-Calzada J.P.: Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an Oedipus complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (2005): 19-25.
- Bartee L., Bender J.: Two *Arabidopsis* methylation-deficiency mutations confer only partial effects on a methylated endogenous gene family. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001): 2127-2134.
- Bartee L., Malagnac F., Bender J.: *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev.* 15 (2001): 1753-1758.

- Baulcombe D.C., English J.J.: Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996): 173–180.
- Baylin S.B., Belinsky S.A., Herman J.G.: Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise. *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000): 1460-1461.
- Beclin C., Boutet S., Waterhouse P., Vaucheret H.: A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* 12 (2000): 684-688.
- Beerens N., Hoeijmakers J.H., Kanaar R., Vermeulen W., Wyman C.: The CSB protein actively wraps DNA. *J. Biol. Chem.* 280 (2005): 4722-4729.
- Bender J.: DNA methylation of the endogenous *PAI* genes in *Arabidopsis*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69 (2004): 145-153.
- Berger F.: Plant sciences. Imprinting--a green variation. *Science* 303 (2004): 483-485.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (2001): 363-366.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., Ingram, V.: Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 203 (1988): 971-983.
- Bevan M.W., Flavell R.B., M.D. Chilton.: A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304 (1983): 184-187.
- Bird A.P.: Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* 11 (1995): 94–100.
- Bost R.G., Cribbs R.M.: Suppression of a missense mutation in the L-ribulokinase gene of *Escherichia coli*. *Genetics* 62 (1969): 1-8.
- Brandstädter J., Rossbach C. Theres K.: The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta*, 192 (1994): 69-74.
- Brzeski J., Jerzmanowski A.J.: Deficient in DNA Methylation 1 (DDM1) Defines a Novel Family of Chromatin-remodeling Factors. *Biol. Chem.* 278 (2003): 823–828.
- Brzeski J., Jerzmanowski A.J.: Plant chromatin – epigenetics linked to ATP-dependent remodeling and architectural proteins. *FEBS Lett.* 567 (2004): 15-19.
- Brockdorff N.: X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA. *Trends Genet.* 18 (2002): 352-358.

- Burn J.E., Bagnall D.J., Metzger J.D., Dennis E.S., Peacock W.J.: DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993): 287-291.
- Busslinger M., deBoer E., Wright S., Grosveld F.G., Flavell R.A.: The sequence GGC^mCGG is resistant to *MspI* cleavage. *Nucleic Acids Res.* 11 (1983): 3559–3569.
- Cao X., Aufsatz W., Zilberman D., Mette M.F., Huang M.S., Matzke M., Jacobsen S.E.: Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr. Biol.* 13 (2003): 2212-2217.
- Cao X., Jacobsen S.E.: Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* 12 (2002 a): 1138-1144.
- Cao X., Jacobsen S.E.: Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the *DRM* and *CMT3* methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002 b): 16491-16498.
- Cao X., Springer N.M., Muszynski M.G., Phillips R.L., Kaeppler S., Jacobsen S.E.: Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000): 4979-4984.
- Caruthers J.M., McKay D.B.: Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002): 123-133.
- Catcheside D.G.: A position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 38 (1938): 345-352.
- Catcheside D.G.: The *P*-locus position effect in *Oenothera*. *J. Genet.* 48 (1947): 31-42.
- Chaboute M.E., Combettes B., Clement B., Gigot C., Philipps G.: Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Mol. Biol.* 38 (1998): 797-806.
- Chan S.W., Henderson I.R., Jacobsen S.E.: Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005): 351-360.
- Chandler V.L., Vaucheret H.: Gene activation and gene silencing. *Plant Physiol.* 125 (2001): 145-148.
- Chandler V.L., Stam M.: Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat. Rev. Genet.* 5 (2004): 532-544.
- Chen I.-P., Haehnel U., Altschmied L., Schubert I., Puchta H.: The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress – a high-density colony array study (HDCA). *Plant J.* 35 (2003): 771-786.

- Colot V., Maloisel L., Rossignol J.L.: Interchromosomal transfer of epigenetic states in *Ascobolus*: transfer of DNA methylation is mechanistically related to homologous recombination. *Cell* 86 (1996):855-864.
- Colot V., Rossignol J.L.: Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21 (1999): 402-411.
- Cote J., Quinn J., Workman J.L., Peterson C.L.: Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265 (1994): 53-60.
- Culligan K., Tissier A., Britt A.: ATR Regulates a G2-Phase Cell-Cycle Checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16 (2004): 1091-1104.
- Dean W., Lucifero D., Santos F.: DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res. C Embryo Today*. 75 (2005): 98-111.
- Delaval K., Feil R.: Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14 (2004): 188-95.
- Deuring R., Fanti L., Armstrong J.A., Sarte M., Papoulas O., Prestel M., Daubresse G., Verardo M., Moseley S.L., Berloco M., Tsukiyama T., Wu C., Pimpinelli S., Tamkun J.W.: The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell*. 5 (2000): 355-365.
- Ebert A., Schotta G., Lein S., Kubicek S., Krauss V., Jenuwein T., Reuter G.: Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18 (2004): 2973-2983.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A.: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429 (2004): 457-463.
- Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C.: Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 23 (1995): 2715-2723.
- Elledge S.J., Davis R.W.: Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* 4 (1990): 740-751.
- Fagard M., Vaucheret H.: (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51(2000): 167-194.
- Finnegan E.J., Kovac K.A.: Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 189-201.

- Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S.: Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996): 8449-8454.
- Fischer A., Hofmann I., Naumann K., Reuter G.: Heterochromatin proteins and the control of heterochromatic gene silencing in Arabidopsis. J. Plant Physiol. 163 (2006): 358-368.
- Flavell R.B.: Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 3490-3496.
- Fraley R.T., Rogers S.B., Horsch R.B.: Use of a chimeric gene to confer antibiotic resistance to plant cells. Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia 20 (1983a): 211-221.
- Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C.: Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 80 (1983b): 4803-4807
- Framond A.J., Bevan M.W., Barton K.A., Flavell F., Chilton M.D.: Mini-Ti plasmid and a chimeric gene construct: new approaches to plant gene vector construction. Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia 20 (1983): 159-170
- Friedman O.M., Mahapatra G.N., Stevenson R.: The methylation of deoxyribonucleosides by diazomethane. Biochim. Biophys. Acta 68 (1963): 144-146.
- Fujita N., Watanabe S., Ichimura T., Tsuruzoe S., Shinkai Y., Tachibana M., Chiba T., Nakao M.: Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. J. Biol. Chem. 278 (2003): 24132-24138.
- Fuks F., Hurd P.J., Wolf D., Nan X., Bird A.P., Kouzarides T.: The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J. Biol. Chem. 278 (2003): 4035-4040.
- Furner I.J., Sheikh M.A., Collett C.E.: Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: genetic modifiers and DNA methylation. Genetics 149 (1998): 651-662.
- Gendrel A.V., Lippmann Z., Yordan C., Colot V., Martienssen R.A.: Dependence of heterochromatic Histone H3 Methylation patterns on the *Arabidopsis* Gene *DDMI*. Science 297 (2002): 1871-1873.

- Genger R.K., Kovac K.A., Dennis E.S., Peacock W.J., Finnegan E.J.: Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 41 (1999): 269-278.
- Gold M., Hurwitz J., Anders M.: The enzymatic methylation of RNA and DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11 (1963): 107-114.
- Hall A.E., Keith K.C., Hall S.E., Copenhaver G.P., Preuss D.: The rapidly evolving field of plant centromeres. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004): 108-114.
- Hall M.C., Matson S.W.: Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* 34 (1999): 867-877.
- Hattman S.: DNA-[adenine] methylation in lower eukaryotes. *Biochemistry (Mosc.)* 70 (2005): 550-558.
- Heard E., Rougeulle C., Arnaud D., Avner P., Allis C.D., Spector D.L.: Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* 107 (2001): 727-738.
- Hendrich B., Bird A.: Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998): 6538-6547.
- Hendrich B., Tweedie S.: The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet.* 19 (2003): 269-277.
- Henikoff S., Comai L.: A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149 (1998): 307-318.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., van Montagu M., Schell J.: Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303 (1983): 209-213.
- Hirochika H., Okamoto H., Kakutani T.: Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12 (2000): 357-369.
- Hofmann I.: Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2004).
- Holmes D.S., Quigley M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 (1981): 193-197.
- Iglesias V., Moscone E., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan S., Spider S., Matzke M., Matzke A.: Molecular and Cytogenetic Analysis of Stably and Unstably Expressed Transgene Loci in Tobacco. *Plant Cell* 9 (1997): 1251-1264.

- Jackson J.P., Lindroth A.M., Cao X., Jacobsen S.E.: Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416 (2002): 556-560.
- Jacobsen S.E., Sakai H., Finnegan E.J., Cao X., Meyerowitz E.M.: Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 10 (2000): 179-186.
- Jaenisch R., Hochedlinger K., Eggan K.: Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation. *Novartis Found. Symp.* 265 (2005): 107-18, discussion 118-28.
- Jeddeloh J.A., Stokes T.L., Richards E.J.: Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* 22 (1999): 94-97.
- Jenuwein T., Allis C.D.: Translating the histone code. *Science* 293 (2001): 1074-1080.
- Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R.: TRANSPARENT TESTA GLABRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14 (2002a): 1359-1375.
- Johnson L., Cao X., Jacobsen S.: Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol.* 12 (2002b): 1360-1367.
- Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J., Baulcombe D.C.: RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11 (1999): 2291-2301.
- Jones L., Ratcliff F., Baulcombe D.C.: RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.* 11 (2001): 747-757.
- Jones A. L., Thomas C. L., Maule A. J.: *De novo* methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.* 17 (1998): 6385-6393.
- Jorgensen R.: Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8 (1990): 340-344.
- Kakutani T., Jeddeloh J.A., Flowers S.K., Munakata K., Richards E.J.: Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1996): 12406-12411.
- Kakutani T., Jeddeloh J.A., Richards E.J.: Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucleic Acids Res.* 11 (1995): 130-137.

- Kakutani T., Munakata K., Richards E.J., Hirochika H.: Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 151 (1999): 831-838.
- Kankel M.W., Ramsey D.E., Stokes T.L., Flowers S.K., Haag J.R., Jeddloh J.A., Riddle N.C., Verbsky M.L., and Richards E.J.: *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163 (2003): 1109-1122.
- Kato M., Miura A., Bender J., Jacobsen S.E., Kakutani T.: Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 13 (2003): 421-426.
- Kishimoto N., Sakai H., Jackson J., Jacobsen S.E., Meyerowitz E.M., Dennis E.S., Finnegan E.J.: Site specificity of the *Arabidopsis* MET1 DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus. *Plant Mol. Biol.* 46 (2001): 171-183.
- Kolberg M., Strand K.R., Graff P., Andersson K.K.: Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699 (2004): 1-34.
- Koncz C., Schell J.: The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986): 383-396.
- Krieg D.R.: Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. *Genetics* 48 (1963): 561-580.
- Laman H., Balderes D., Shore D.: Disturbance of normal cell cycle progression enhances the establishment of transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995): 3608-3617.
- Laurent B.C., Treich I., Carlson M.: The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* 7 (1993): 583-591.
- Lee D.W., Zhang K., Ning Z.Q., Raabe E.H., Tintner S., Wieland R., Wilkins B.J., Kim J.M., Blough R.I., Arceci R.J.: Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia. *Cancer Res.* 60 (2000): 3612-3622.
- Li E., Bestor T.H., Jaenisch R.: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69 (1992): 915-926.
- Lincker F., Philipps G., Chaboute M.-E.: UV-C response of the ribonucleotide reductase large subunit involves both E2F-mediated gene transcriptional regulation and protein subcellular relocation in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004): 1430-1438.

- Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S., Jacobsen S.E.: Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292 (2001): 2077-2080.
- Lippman Z., May B., Yordan C., Singer T., Martienssen R.: Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *P.L.o.S. Biol.* 1 (2003): 420-428
- Lippman Z., Gendrel A.V., 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.: Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430 (2004): 471-476.
- Loidl P.: A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci.* 9 (2004): 84-90.
- Lord E.M., Russel S.D.: The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18 (2002): 81-105.
- Lori F., Malykh A., Cara A., Sun D., Weinstein J.N., Lisziewicz J., Gallo R.C.: Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. *Science* 266 (1994): 801-805.
- Lyko F., Brown R.: DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005): 1498-506.
- Malagnac F., Bartee L., Bender J.: An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.* 21 (2002): 6842-6852.
- Malagnac F., Wendel B., Goyon C., Faugeron G., Zickler D., Rossignol J.L., Noyer-Weidner M., Vollmayr P., Trautner T.A., Walter J.: A gene essential for de novo methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell* 91 (1997): 281-290.
- Maquat L.E.: When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1 (1995):453-465.
- Martienssen R.: Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends Genet.* 14 (1998): 263-264.
- Mathieu O., Jasencakova Z., Vaillant I., Gendrel A.V., Colot V., Schubert I., Tourmente S.: Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15 (2003):2929-2939.
- Mathieu O., Probst A.V., Paszkowski J.: Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 24 (2005): 2783-2791.

- Matzke M.A., Matzke A.J., Kooter, J.M.: RNA: guiding gene silencing. *Science* 293 (2001): 1080-1083.
- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A. J. M.: Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8 (1989): 643-649.
- Mayhew C.N., Mampuru L.J., Chendil D., Ahmed M.M., Phillips J.D., Greenberg R.N., Elford H.L., Gallicchio V.S.: Suppression of retrovirus-induced immunodeficiency disease (murine AIDS) by trimidox and didox: novel ribonucleotide reductase inhibitors with less bone marrow toxicity than hydroxyurea. *Antiviral Res.* 56 (2002a): 167-181.
- Mayhew CN, Phillips JD, Cibull ML, Elford HL, Gallicchio VS. Short-term treatment with novel ribonucleotide reductase inhibitors Trimidox and Didox reverses late-stage murine retrovirus-induced lymphoproliferative disease with less bone marrow toxicity than hydroxyurea. *Antivir. Chem. Chemother.* 13 (2002b): 305-314.
- Mayhew C.N., Phillips J.D., Greenberg R.N., Birch N.J., Elford H.L., Gallicchio V.S.: *In vivo* and *in vitro* comparison of the short-term hematopoietic toxicity between hydroxyurea and trimidox or didox, novel ribonucleotide reductase inhibitors with potential anti-HIV-1 activity. *Stem Cells.* 17 (1999): 345-356.
- Mayhew CN, Sumpter R, Inayat M, Cibull M, Phillips JD, Elford HL, Gallicchio VS. Combination of inhibitors of lymphocyte activation (hydroxyurea, trimidox, and didox) and reverse transcriptase (didanosine) suppresses development of murine retrovirus-induced lymphoproliferative disease. *Antiviral Res.* 65 (2005): 13-22.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S.: Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* 18 (2000): 455-457.
- Melquist S., Bender J.: Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17 (2003): 2036-47.
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M.: Transcriptional silencing and promotor methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19 (2000): 5194-5201.
- Mette M.F., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M.: Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters *in trans*. *EMBO J.* 18 (1999): 241-248.

- Michel A.H., Kornmann B., Dubrana K., Shore D.: Spontaneous rDNA copy number variation modulates Sir2 levels and epigenetic gene silencing. *Genes Dev.* 19 (2005): 1199-1210.
- Mittelsten Scheid O., Afsar K., Paszkowski J.: Release of epigenetic gene silencing by *trans*-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (1998): 632-637.
- Mittelsten Scheid O., Paszkowski J.: Transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 235-241.
- Mittelsten Scheid O., Paszkowski J., Potrykus I.: Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 228 (1991): 104-112.
- Mittelsten Scheid O., Probst A.V., Afsar K., Paszkowski J.: Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002): 13659-13662.
- Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K., Toyama T., Shimada H., Kakutani T.: Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411 (2001): 212-214.
- Morel J.B., Mourrain P., Beclin C., Vaucheret H.: DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 10 (2000): 1591-1594.
- Murai N., Sutton D.W., Murray M.G., Slightom J.L., Merlo D.J., Reichert N.A., Sengupta-Gopalan C., Stock C.A., Barker R.F., Kemp J.D., Hall T.C.: Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222 (1983): 476-482.
- Nachman M.W.: Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002): 657-663.
- Napoli C., Lemieux C, Jorgensen R.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in a reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 2 (1990): 279-289.
- Naumann K., Fischer A., Hofmann I., Krauss V., Phalke S., Irmeler K., Hause G., Aurich A.C., Dorn R., Jenuwein T., Reuter G.: Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 24 (2005):1418-29.
- Okano M., Xie S., Li E.: Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19 (1998): 219-220.

- Papa C.M., Springer N.M., Muszynski M.G., Meeley R., Kaeppler S.M.: Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *Plant Cell* 13 (2001): 1919-1928.
- Pelissier T., Thalmeir S., Kempe D., Sanger H.L., Wassenegger M.: Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999): 1625–1634.
- Philipps G., Clement B., Gigot C.: Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* 358 (1995): 67-70.
- Pradhan S., Bacolla A., Wells R.D., Roberts R.J.: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* 74 (1999): 33002-33010.
- Probst A.V., Fagard M., Proux F., Mourrain P., Boutet S., Earley K., Lawrence R.J., Pikaard C.S., Murfett J., Furner I., Vaucheret H., Mittelsten Scheid O.: *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* 16 (2004): 1021-1034.
- Raabe E.H., Abdurrahman L., Behbehani G., Arceci R.J.: An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev. Dyn.* 221 (2001): 92-105.
- Radvoyevitch T., Kashlan O.S., Cooperman S.: Rational polynomial representation of ribonucleotide reductase activity. *BMC Biochem.* 6:8 (2005).
- Reik W., Walter J.: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001): 21-32.
- Reuter G., Spierer P.: Position-effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays* 14 (1992): 605-612.
- Richards E.J.: *Arabidopsis thaliana* centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure. *Genome Res.* 7 (1997): 1045-1053.
- Richmond E., Peterson C.L.: Functional analysis of the DNAstimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Res.* 24 (1996): 3685–3692.
- Robertson K.D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P.A., Jones P.L., Wolffe A.P.: DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* 25 (2000): 338-42.
- Robertson K.D.: DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005): 597-610.

- Ronemus M.J., Galbiati, M., Ticknor C., Chen J., Dellaporta S.L.: Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273 (1996): 654-657.
- Rountree M.R., Bachman K.E., Baylin S.B.: DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* 25 (2000): 269-277.
- Ruiz-Garcia L., Cervera M.T., Martinez-Zapater J.M.: DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta* 222 (2005): 301-306.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (1988): 487-491.
- Santoro R., Li J., Grummt I.: The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat. Genet.* 32 (2002): 393-396.
- Sauge-Merle S., Falconet D., Fontecave M.: An active ribonucleotide reductase from *Arabidopsis thaliana* cloning, expression and characterization of the large subunit. *Eur. J. Biochem.* 266 (1999): 62-69.
- Saze H., Mittelsten Scheid O., Paszkowski J.: Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genet.* 34 (2003): 65-69.
- Scannell J.P., Crestfield A.M., Allen F.W.: Methylation studies on various uracil derivatives and on an isomer of uridine isolated from ribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 32 (1959): 406-412.
- Scarano M.I., Strazzullo M., Matarazzo M.R., D'Esposito M.: DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J. Cell. Physiol.* 204 (2005): 21-35.
- Schell J., van Montagu M., Holsters M., Zambryski P., Joos H., Inze D., Herrera-Estrella L., Depicker A., de Block M., Caplan A., Dhaese P., Van Haute E., Hernalsteens J-P., de Greve H., Leemans J., Deblaere R., Willmitzer L., Schroder J., and Otten L.: Ti plasmids as experimental gene vectors for plants. *Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia* 20 (1983): 191-209.
- Schultz J.: Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 22 (1936): 27-33.
- Scott R.J., Spielman M.: Epigenetics: imprinting in plants and mammals--the same but different? *Curr. Biol.* 14 (2004): R201-R203.
- Selker E.U.: Gene silencing: repeats that count. *Cell* 97 (1999): 150-160.

- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J.N., Kooter J.M.: Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr. Biol.* 11 (2001): 436-440.
- Singer T., Yordan C., Martienssen R.A.: Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)*. *Genes Dev.* 15 (2001): 591-602.
- Smith C.L., Peterson C.L.: A conserved Swi2/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005): 5880-5892.
- Soppe W.J.J., Jasencakova Z., Houben A., Kakutani T., Meister A., Huang M.S., Jacobsen S.E., Schubert I., Fransz P.F.: DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21 (2002): 6549-6559
- Spofford J.B.: Position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London (1976): 955-1019.
- Steimer A., Amedeo P., Afsar K., Fransz P., Mittelsten Scheid O., Paszkowski J.: Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (2000): 1165-1178.
- Strahl B.D., Allis C.D.: The language of covalent histone modifications. *Nature* 403 (2000): 41-45.
- Sun L.Q., Arceci R.J.: Altered epigenetic patterning leading to replicative senescence and reduced longevity. A role of a novel SNF2 factor, PASG. *Cell Cycle* 4 (2005): 3-5.
- Szerlong H., Saha A., Cairns B.R.: The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling. *EMBO J.* 22 (2003): 3175-3187.
- Takeda S., Tadele Z., Hofmann I., Probst A.V., Angelis K.J., Kaya H., Araki T., Mengiste T., Mittelsten Scheid O., Shibahara K., Scheel D., Paszkowski J.: BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18 (2004): 782-793.
- Tamaru H. and Selker E.U.: A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414 (2001): 277-283.
- Tariq M., Saze H., Probst A.V., Lichota J., Habu Y., Paszkowski J.: Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003): 8823-8827.

- Tartof K.D.: Position effect variegation in yeast. *Bioessays* 16 (1994): 713-714.
- Tomari Y., Zamore P.D.: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 19 (2005): 517-529.
- Tompa R., McCallum C.M., Delrow J., Henikoff J.G., van Steensel B., Henikoff S.: Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr. Biol.* 12 (2002): 65-68.
- Tsimberidou A.M., Alvarado Y., Giles F.J.: Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2 (2002): 437-448.
- Turner B.M.: Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22 (2000): 836-845.
- van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N.M., Stuitje A.R.: Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2 (1990): 291-299.
- Vaucheret H., Beclin C., Fagard M.: Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114 (2001):3083-3991.
- Vaucheret H. and Fagard M.: Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17 (2001): 29-35.
- Verbsky M.L., Richards, E.J.: Chromatin remodeling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001): 494-500.
- Vignali M., Hassan A.H., Neely K.E., Workman J.L.: ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000): 1899-1910.
- Vongs A., Kakutani T., Martienssen R.A., Richards E.J.: *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260 (1993): 1926-1928.
- Wang C., Liu Z.: *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell* 18 (2006): 350-365.
- Waddington C.H.: Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150 (1942): 563-565.
- Wassenegger M.: RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43 (2000): 203-220.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L.: RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76 (1994): 567-576.
- Weiler K.S. and Wakimoto B.T.: Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29 (1995): 577-605.

- Wells D.N.: Animal cloning: Problems and prospects. *Rev. Sci. Tech.* 24 (2005): 179-190.
- Wilkinson C. R., Bartlett R., Nurse P., Bird A.P.: The fission yeast gene *pmt1+* encodes a DNA methyltransferase homologue. *Nucleic Acids Res.* 23 (1995): 203–210.
- Wrzeska M., Rejduch B.: Genomic imprinting in mammals. *J. Appl. Genet.* 45 (2004): 427-433.
- Xiang C., Han P., Lutzinger I., Wang K., Oliver D.J.: A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 40 (1999): 711-717.
- Yano M., Ouchida M., Shigematsu H., Tanaka N., Ichimura K., Kobayashi K., Inaki Y., Toyooka S., Tsukuda K., Shimizu N., Shimizu K.: Tumor-specific exon creation of the HELLS/SMARCA6 gene in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 112 (2004): 8-13.
- Ye F., Signer E.R.: RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 10881-10886.
- Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H.: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13 (1997): 335-340.
- Zamore P. D.: Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science.* 296 (2002): 1265-1269.
- Zemach A., Grafi G.: Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *Plant J.* 34 (2003): 565-572.
- Zemach A., Li Y., Wayburn B., Ben-Meir H., Kiss V., Avivi Y., Kalchenko V., Jacobsen S.E., Grafi G.: DDM1 binds *Arabidopsis* methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization. *Plant Cell* 17 (2005): 1549-1558.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobson, S.E.: ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299 (2003): 716-719.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

7.1.1. SSLP-Primer

Tabelle 7: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten SSLP-Primer

Name	assoziierter Lokus	Koordinaten im Ökotyp Columbia (bp)	Polymorphismus	Primersequenzen	Anneal...- Temp. (°C)
BIO2b	At2g43360	18019881- 18020021	Col 141 bp Ler 202 bp	TGACCTCCTCTTCCATGGAG TTAACAGAAACCCAAAAGCTTTC	55
CER 454368	At5g53360	21665723- 21665909	Col144 bp < Ler	TATGTTCAACCTGTAAATCAAGA CAGCACACTCCGAGCCAGCATA	55
CER 454907	At5g49960	20345255- 20345410	Col 28 bp > Ler	AATCATTTTACCGCCACAA GACAGTCATCGCATAAATAAAAAGAAT	50
CER 457042	At5g52070	21182104- 21182263	Col 23 bp > Ler	ACGTGAGTAGGAGGAAGC TGGACATGGATAAAAAGCACAA	54
CER 457578	At5g52880	21454826- 21454976	Col 28 bp > Ler	AACAGTGTAGCAGAAAAGGATTA GAAAGTGGGGTAGGTTAGTTG	55
CIW3	At2g14890	6409928- 6410163	Col 230 bp Ler 200 bp	GAAACTCAATGAAATCCACTT TGAACTTGTGTGAGCTTGA	52
CIW9	At5g42600	17061229- 17061394	Col 165 bp Ler 145 bp	CAGACGTATCAAATGACAAATG GACTACTGCTCAAACATTCGG	55
CIW10	At5g60960	24548097- 24548233	Col 140 bp Ler 130 bp	CCACATTTTCCTTCTTTCATA CAACATTTAGCAAATCAACTT	52
F2G1	At2g21590	9245744- 9245851	Col < Ler	AACTTTTACATGTTGAGAAGCTAA CTAACAATGCTGTTTATAATGGTTT	48
F3K23	At2g21420	9178511- 9178862	Col < Ler	ATTGTGTAGATGTGGATTTGAGTT TTTCATGACTTTCACATTAATACCT	55
F5I14- 49495	At1g65550	24374008- 23474203	Col 195 bp Ler > Col	CTGCCTGAAATTGTCGAAAC GGCATCACAGTCTGATTCC	55
F7D8	At2g21770	9297160- 9297296	Col < Ler	TCTTTGTTAGTGTAACCCAGTTATGG TCCAATAGAATGAAAGTTAAATCAC	52

F14M13	At2g22350	9502688-9502809	Col 222 bp Ler 204 bp	CAATGCAATAATCATATCTAAATCC GATAATCAGTAAAAGGGAGTTTTTC	55
F16J13	At4g12070	7233065-7233344	Col 280 bp Ler 269 bp	TCAACATTTTCATATTAATCTCTCA TTAGTGTAGTCACACATTCATTTT	55
F26C17 II	At5g28200	10180644-10180878	Col < Ler	AACAAACCGGATACTATGTTAGTTA AGATAAATCAGAGGTTAGGAGTCAT	52
GAPAB	At3g26650	9796459-9796591	Col 142 bp Ler 150 bp	TCCTGAGAATTCAGTGAAACCC CACCATGGCTTCGGTACTT	55
K20J1	At5g49110	19919836-19920122	Col > Ler	CAAGAGTGAAGGAAGTAGTTTATGA GTTGTGCTTTCAACAATAAAAAGTT	55
NGA6	At3g62220	23042025-23042167	Col 143 bp Ler 123 bp	ATGGAGAAGCTTACACTGATC TGGATTTCTTCTCTCTTCAC	55
NGA8	At4g08830	5628810-5628966	Col 154 bp Ler 198 bp	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC GAGGGCAAATCTTATTTCGG	55 besser 52
NGA76	At5g28470	10418614-10418844	Col 231 bp Ler > 250 bp	AGGCATGGGAGACATTTACG GGAGAAAATGCACTCTCCACC	52
NGA111	At1g72650	27356874-27357001	Col 128 bp Ler 162 bp	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	52 besser 55
NGA151	At5g14480	4669932-4670081	Col 154 bp Ler 198 bp	GTTTTGGGAAGTTTGCTGG CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG	55 besser 52
NGA162	At3g13960	4608284-4608390	Col 107 bp Ler 89 bp	CATGCAATTTGCATCTGAGG CTCTGCACTCTTTCTCTGG	55
NGA168	At2g39010	16298919-16299069	Col 151 bp Ler 135 bp	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG TCGTCTACTGCACTGCCG	55
NGA361	At2g31070	13229491-13229591	Col 114 bp Ler 120 bp	AAAGAGATGAGAATTTGGAC ACATATCAATATATTAAGTAGC	48
NGA1126	At2g27330	11703392-11703582	Col 191 bp Ler 199 bp	GCACAGTCAAAGTCACAACC CTCTACGCTTTTCGTTAAAG	52
NGA1139	At4g34390	16444155-16444268	Col 114 bp Ler 118 bp	TTTTTCCTTGTTGTCATTCC TAGCCGGATGAGTTGGTACC	55
NGA1145	At2g02540	683625-683837	Col 213 bp Ler 217 bp	GCACATACCCACAACCAGAA CCTTCACATCCAAAACCCAC	55
PLS2	At2g29290	8374338-8374492	Col 155 bp Ler > Col	TACGCGAATTATTTTTAGGAGA AATTTATTTGAGTCGGATGC	52
PLS3	At2g20910	9001884-9002058	Col 175 bp Ler > Col	TAGTCGTTTCTCTGGTTGTAG TTGCCTGTCGATGTAGATTGT	55
PLS5	At2g21420	9178570-9178697	Col 128 bp Ler > Col	GATGCCTTCTCCTGGTTG AATATAGCCGTCGTCTTCATCA	55

PLS7	At2g23030	9813750-9813858	Col 109 bp Col > Ler	GATGAATCTTCTCGTCCAAAAT GACAAACTAAACAACATCCTTCTT	52
SNP F3L17	At4g31560	15294381-15294627	Col 147 bp Ler 220 bp	GTGTCGAATAATTTTGCTTTATATT CCACTACAGTTTTTATCATTATTGG	55
SNP F3F24 II	At5g28927	10960095-10960523	Col > Ler	GGATGATTATGCTTCTAATTTATCA TGAATCTAGTAAGTTTCAGTTTCGT	55
SNP F26C17 II	At5g28200	10180644-10180868	Col < Ler	AACAAACCGGATACTATGTTAGTTA AGATAAATCAGAGGTTAGGAGTCAT	52
SNP K1F13	At5g66430	26543550-26543727	Col 18 bp > Ler	GACTCCAGACACGAAGCACA GATGGCTGAGATCGTGAACA	55
SNP K3G17	At5g67260	26852556-26852777	Col 222 bp Ler 198 bp	TCCTTTGTTGTTTTGTTCAATCTT TCGAACCTGTCTCGCTTCTT	55
SNP MUD21	At5g66850	26714006-26714242	Col 237 bp Ler 259 bp	CCCCTTCAAACCTCACTCCAA GTACTGGATGGCACCAGAGG	55
SNP T2L5	At5g34890	13222572-13222796	Col 225 bp Ler 183 bp	ATGCCGTCGAAAATAGTGAG CGAAGCTGAAGCAAATGTCA	55
SO191	At5g37780	15021915-15022062	Col 148 bp Ler 156 bp	TGATGTTGATGGAGATGGTCA CTCCACCAATCATGCAAATG	52
SO262	At5g27670	9792645-9792791	Col 147 bp Ler 159 bp	ATCATCTTCCCATGGTTTTT TTGCTTTTTGGTTATATTCCGA	52
T1P17	At4g12410	7342490-7342894	Col > Ler	TCTAAATATTGATTGTTTCACTTCA ATACAGTACAGAGAAGGATGATTC	52
T16B14	At2g22122	9409878-9410144	Col < Ler	AACTATTGCACTGATATTTTTATGG AAATATTTGTAAATAACTCGCAATG	52 besser 50
T16B14 II	At2g22060	9389454-9389709	Col < Ler	TTATTTGTTGATGCAATGTTCTAA CTGAACATTTGTATTACACTTTTT	50
T16B14 III	At2g22030	9378556-9378804	Col > Ler	ATGATGGTTGTAATACATTTTGAGT GAGATACATAAAAAGCTTGGAACATA	55
T26C19	At2g22150	9428364-9428625	Col > Ler	GCTTTGGAGTTTTAATAAAGAGTTT TTTTATTATACATATTTGGGGTTA	52
T27K12- SP6	At1g42460	15926702-15926847	Col 146 bp Ler 152 bp	GGACAACGTCTCAAACGGTT GGAGGCTATACGAATCTTGACA	52
T30L20	At2g22760	9683764-9683832	Col 169 bp Ler 139 bp	TTTTGCTCATATTAATTCATTATCC ATATAAGATCCAAAATTAAGGCTTC	52

7.1.2 CAPS-Primer

Tabelle 8: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten CAPS-Primer

Name und Restriktions-Enzym	assoziierter Locus	Koordinaten im Ökotyp Columbia (bp)	Polymorphismus	Primersequenz	Anneal.-Temp. (°C)
F2G1 III EcoRI	At2g21690	9276550- 9276893	Col 344 bp Ler 114 bp & 230 bp	TTTAAATGTCTGAAAATCTGAAATC CAAGAAACAGAGGATATATGAAGAA	55

7.1.3 Sequenzierungs-, Klonierungs- und Komplementations-Primer

Tabelle 9: Verzeichnis der verwendeten Primer zur Klonierung, Sequenzierung und Komplementation

Name	Primersequenz	Annealing-Temperatur (°C)
CMT3a	TCTCAGATTATTTAGTCCTCACACT GTAACAAATGCAATTTAGACGTAAT	55
CMT3b	ATATGAACGTTTATCATGTTGTTTT CAAATCTGAGAAAGATTATTAGCAAG	55
CMT3c	CTTCTCAGATTTGTTAATCTCTCA AGAACAACATAAGACCCATAGAACT	55
CMT3d	AACAGTTGATGTTTAGAGCAATATC TATTCCTAGACACTAAAACAGACCA	55
CMT3e	TGGTCTGTTTTAGTGCTAGGAATA GGTCTAAAGATAAATCCTAGGAAAA	55
DDM-F1	TAAGAAAATAGGCGTAAATATGAGA GTAAGTTACTTTCTCAAACAAGCAG	52
DDM-F2	TGTTGGTTCCATTTATATAATTTTC TAATAGTAGAAAAGGACCATGTTTG	52
DDM-F3	TTGGTCTTTGTTAAATTTTATTCTG AAATATACTACAGCTGCTCTTCTCA	52
DDM-F4	CTTTAAGCAATATTCTGACCAAA AACTCCGAGCCCTCTAATAAT	52
FBOX 1	CTTATTCCTTAAGTTTTTCTCACTG GAGCATAGCTACATAATACAAAACA	56
FBOX 2	GTGATTACAAAAGTGTGTATGAT GAAGTTCAAACAGAAAGTCTACAT	56

FBOX 1 neu	TCCTTTCATATTTCTTCTCTTATTC CATAAGGTAAGTTGGTTTAGAAGAC	52
FBOX 2 neu	ATGAAATCGTACTTGATTAATTCCT ATTGATACACAAATCAGGAGTATCT	52
KOMPL1	TTCCTAGTATATCAAGGATTCATC TTGAGATTAACAGTAACAGTAGCAG	55
KOMPL2	TAAGTAACAGTCATCATTCTGTAGC ATCGATAGAGAAATCAGTGATAAAC	55
MET1-1	TAGTGATGATTTTGTGGTAATTTT ATGTAGAACATATTTGAAGCAGAAC	55
MET1-2	GAGGATTAAGAAGTTTCTCAAGTT TAAACTGCAAAAAGCTGTAAAATAA	55
MET1-3	ATAAGCATTCTTACTTTTCTTAGGG CAGTGATGTTCTTTTCTTATACTG	55
MET1-4	TTACAAAGAGGATCTATGACTGTTC TTAATAGTAGAGAACTTTGGCTTCA	55
MET1-5	TATACCTCTTCTCACTTCGTATTG GCTAATATCATTTCACACTGAACTT	55
MET1-6	GTCAGGTATATATTCAGATTGTGG TGTATAAGACTGACCTTCTCTTTG	55
MET1-7	GAAATTCTGTTTCTTGCAGTATAA TAGGCTTCTTTATCAAAAGTATCA	55
REPAIR1	GATATTGCTTCTTCTTCTCCTTC AATTATGAACTTAAACGACAATCTT	55
REPAIR2	TACTGAAAGCTCTTTTAATACTCC AATCTCTCTTCTCTCCACTTTAT	55
riboredu1	GACAAAATCACAAGAAAGTAGAAAC CAAGAGTTTAAATCCAAAGTAATC	55
riboredu2	TCTTATAAATCACTGACTTGTGTGT AACAGGAATTTGAGTTACTAAAGAA	55
riboredu3	ACTCAAATCCTGTTATCTCAATAC ATAAAGTCAGCATAACAATCCAC	55
riboredu4	CATCAATTATATCAATTTGGTTTTT TTCTAACTTTTTAAGACCCAAACTA	55
riboredu4 neu	TCTATAGTTAATGTTGCTGAGATAC TTATACATAATTCTCGTTACAAATC	55
Zf4-2	AGGAGAAGTATTGTGATATCTCTTG GAGTATGACTTTGAGACCATTATTT	55
Zf4-3	AAATAATGGTCTCAAAGTCATACTC TTTCTGTAAATTCATGTTTGTTA	55

7.1.4 RT-PCR-Primer

Tabelle 10: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR-Primer

Name	Restriktionsenzym	Primersequenz	Annealing-Temperatur (°C)
18s rDNA		CGCCTCTAAGTCAGAATCCG	58
AT2G21790 (RIBO)		CTGCTACTGTTACTGTTAATCTCAA AGTATAGAAGTGTAGCGAAGTGAGT	55
DDM1RT		GTGTTACTGTTGTAGAGGAAGAGAT TAAGCTGATAAGACTTTAACTGTCC	55
DDM-F3		TTGGTCTTTGTTAAATTTTATTCTG AAATATACTACAGCTGCTCTTCTCA	52
DNA-REPAIR		GACGAAAGAGATTATCAAAGAGTC TAATAGTCTCCCAACTTCTTCTGT	55
MET1-2		GAGGATTAAGAAGTTTCTCAAGTT TAAACTGCAAAAAGCTGTAAAATAA	55
MET1-4		TTACAAAGAGGATCTATGACTGTTC TTAATAGTAGAGAACTTTGGCTTCA	55
Mut12-1-3	Pst (schneidet im WT aber nicht in Mutante)	CTGATGACTTGAAGGCGATT CTGCGCCAAGTATGTTTCAT	55
Mut12/2/7		TGAGAAGAGCAGCTGTAGTATATTT GCTTATATCGGTTTGTATCAACTTA	55
SKP1		CTAGATGTCACTATCCAATCCTCT TACATTATGTTCTCAATCACACAAG	55
WRKY F7D8		ATACTTTTGAGAAGATCATGGAAG ATTTATACCCATCATCTAAAGCAAC	55
Zf-F7D8-1		ACATTTGCAGAGAGAATATATACGA TTCAAGAACATGTTTACTTTTCAAG	55
ZfF-7D8-2		GTTGTGTTTACTGTTACTCGTTTCT TAACTTTGTTGGTTTCATAGTCTTC	55
ZfF-7D8-3		GAAAGAGTAAACAACCATGTCTAA AACTTCTCATCACAAATAGAACAAG	55
ZfF-7D8-4		TTCTGGCTCTTTCTATAAGTGTA ATATTTGACATTGATCATTCTCTGT	55

7.2 Chromosomen- und Markerkarte

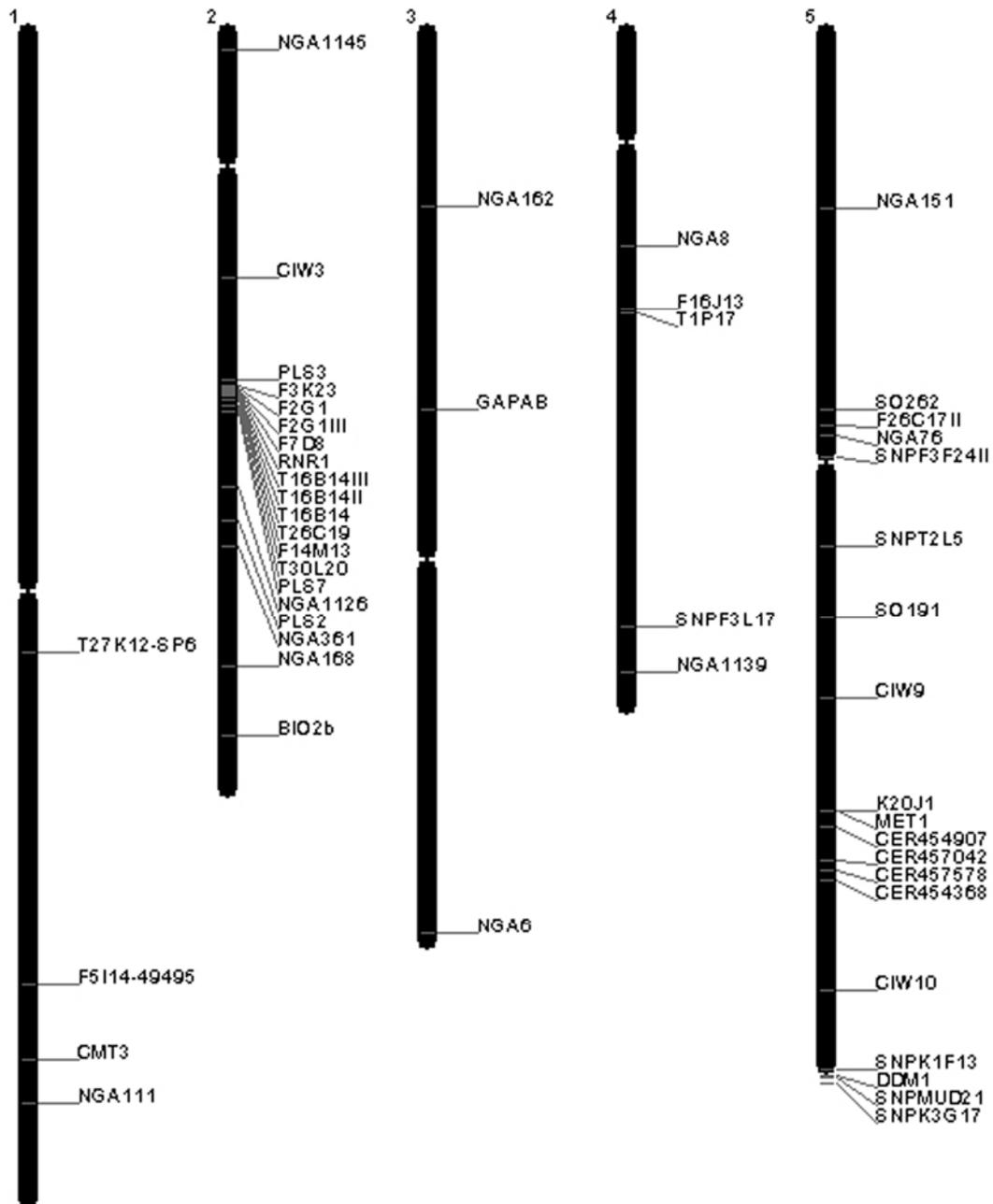


Abbildung 23: Chromosomen- und Markerkarte. Abbildung 23 zeigt die Positionen der in dieser Arbeit verwendeten molekularen Marker, sowie die kartierten Mutationsorte (CMT3, RNR1, MET1 und DDM1) im *Arabidopsis thaliana* Genom.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen und Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gunter Reuter für die Überlassung des besonders interessanten Themas sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dr. Ingo Hofmann danke ich für die Einführung in die Thematik, für seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, seine zahlreichen Anregungen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie für die kritische Betrachtung des Manuskriptes.

Dr. Andreas Fischer möchte ich für seine fachlichen Anregungen, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Betrachtung des Manuskriptes danken.

Dip.-Ing. Katrin Kittlaus danke ich für die zuverlässige Durchführung der Sequenzierung.

Dr. Jan Brzeski (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences and Warsaw University, Laboratory of Plant Molecular Biology, Pawinskiego 5A, 02-106 Warsaw, Poland), Dr. Andrew Flaus (Tom Owen-Hughes Group, Division of Gene Regulation + Expression, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland) und Prof. Dr. Craig Peterson (University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts 01605) möchte ich für ihre zahlreichen fachlichen Anregungen sowie ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik danke ich für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima.

Meinen Eltern und meiner Schwester Angelika-Claudia danke ich für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, sowie ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 22. August 2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian-Robert Fiedler
Geburtsdatum: 21.03.1970
Geburtsort: Beuthen/Oberschlesien (Polen)
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

2002 – 2004: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Hochschulausbildung

2002 – 2006: Doktorarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Prof. Dr. Gunter Reuter
2000 – 2001: Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Prof. Dr. W. Friedt: „Zur Genetik der Nematoden-Resistenz bei Ölrettich (*Raphanus Sativus* L.)“
1998 – 2001: Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1995 – 1998: Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1992 – 1995: Studium der Psychologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Zivildienst

1991 – 1992: DRK-KV Odenwald

Schulausbildung

1983 – 1991: Gymnasium Michelstadt
1981 – 1983: Gesamtschule in Reichelsheim/Odw.
1980 – 1981: Grundschule in Reichelsheim/Odw.
1977 – 1980: Grundschule in Wiesbaden-Klarenthal

Halle, den 22. August 2006