

**Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität
in *Arabidopsis thaliana*
durch die Histon Demethylase *IBM1***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Gregor Klein
aus Tschernowitz, Ukraine

Düsseldorf, Februar 2014

aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Dr. Daniel Schubert
Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2014

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Epigenetik in der Entwicklung von Eukaryoten	1
1.1.1. Die Rolle von Histon-Modifikationen in der Entwicklung von Eukaryoten	1
1.1.2. Die Rolle der DNA-Methylierung in <i>A. thaliana</i>	3
1.1.2.1. Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung	4
1.1.2.2. De novo DNA-Methylierung in <i>A. thaliana</i>	7
1.1.3. Die Rolle von Histon-Demethylasen in der Entwicklung von <i>A. thaliana</i>	7
1.1.3.1. Zwei Klassen der Histon-Demethylasen regulieren die Blühinduktion	8
1.1.3.2. Beziehung von Histon-Demethylasen und der DNA-Methylierung	10
1.2. Blühinduktion und Aufrechterhaltung des Blühens in <i>A. thaliana</i>	13
1.2.1. Das Entwicklungsprogramm des Sprossapikalmeristems	13
1.2.2. Histologischer Hintergrund zur Organbildung am Spross	14
1.2.3. Genetische Signalwege der Blühinduktion	15
1.2.4. <i>FT</i> – das mobile Signal der Blühinduktion	18
1.2.5. Initiation und Spezifikation von floraler Meristemidentität	19
1.2.6. Florale Reversion bei Arabidopsis Mutanten und in mehrjährigen Pflanzen	20
1.3. Zielsetzung der Arbeit	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. Material	25
2.1.1. Chemikalien	25
2.1.2. Enzyme	25
2.1.3. Oligonukleotide	25
2.1.4. Bakterienstämme	25
2.1.5. Vektoren	26
2.1.6. Antibiotika	28
2.1.7. Pflanzenmaterial	28
2.1.8. Antikörper	29
2.1.9. Medien	29
2.1.10. Lösungen und Puffer	29
2.2. Methoden	33
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1. Arbeiten mit Nukleinsäure	33
2.2.1.1.1. Schnelle Extraktion genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	33
2.2.1.1.2. Effiziente Extraktion genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	33
2.2.1.1.3. Extraktion von RNA aus <i>A. thaliana</i>	34
2.2.1.1.4. Quantifizierung von DNA / RNA	34
2.2.1.1.5. Sequenzierung von DNA	34
2.2.1.1.6. Genotypisierung von <i>A. thaliana</i> -Mutanten	34
2.2.1.1.7. cDNA-Synthese auf der Grundlage von mRNA	36
2.2.1.1.8. Gen-Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR	36

2.2.1.2.	Arbeiten mit Escherichia Coli	36
2.2.1.2.1.	Herstellung chemisch kompetenter E. coli	36
2.2.1.2.2.	Transformation kompetenter E. coli mit Plasmid-DNA	37
2.2.1.2.3.	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	37
2.2.1.2.4.	Herstellung von Glycerol-Stocks	37
2.2.1.3.	Arbeiten mit Agrobacterium tumefaciens	38
2.2.1.3.1.	Herstellung kompetenter Zellen von A. tumefaciens	38
2.2.1.3.2.	Transformation kompetenter A. tumefaciens mit DNA-Konstrukten	38
2.2.2.	Methoden der Epigenetik.....	38
2.2.2.1.	Methylierungsabhängige DNA-Restriktion.....	38
2.2.2.1.1.	Restriktion genomischer DNA mit McrBC	39
2.2.2.1.2.	Amplifikation genomischer Regionen	39
2.2.2.1.3.	Semiquantitative Analyse der DNA-Methylierung	40
2.2.2.2.	Bisulfit-Sequenzierung.....	41
2.2.2.2.1.	Bisulfit-Konversion genomischer DNA	41
2.2.2.2.2.	Primerdesign und Amplifikation der Bisulfit-DNA	42
2.2.2.2.3.	Klonierung der Amplifikate	43
2.2.2.2.4.	Blau-Weiss-Selektion der Klone und Sequenzierung	43
2.2.2.2.5.	Sequenzierungsanalyse, Sequenzenabgleich und Auswertung	44
2.2.2.3.	Chromatin-Immunopräzipitation	45
2.2.2.3.1.	Fixierung des Pflanzenmaterials	45
2.2.2.3.2.	Präparation des Chromatins	45
2.2.2.3.3.	Sonifizierung des Chromatins	46
2.2.2.3.4.	Bindung des Antikörpers an magnetische Beads	46
2.2.2.3.5.	Präzipitation des Chromatins mit dem Antikörper	46
2.2.2.3.6.	Eluierung der Immunokomplexe	46
2.2.2.3.7.	Fällung der DNA	47
2.2.2.3.8.	Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA mittels qPCR	47
2.2.3.	Anzucht und Arbeiten mit A. thaliana	48
2.2.3.1.	Sterilisierung von Samen.....	48
2.2.3.2.	Anzucht von A. thaliana	49
2.2.3.3.	Transformation von A. thaliana durch A. tumefaciens.....	49
2.2.3.4.	Kreuzung von A. thaliana Individuen.....	49
2.2.3.5.	GUS-Färbung	50
2.2.4.	Statistische Analysen	50
2.2.5.	Microarray-Analyse.....	51
3.	ERGEBNISSE	52
3.1.	Charakterisierung der <i>ibm1-12</i> Mutante.....	53
3.1.1.	Eigenschaften der <i>ibm1</i> Mutation	53
3.1.2.	Der Phänotyp von <i>ibm1</i> Mutanten	54
3.1.3.	Quantifizierung von lateralen Organen an der primären Sprossachse bei <i>ibm1-12</i> Mutanten	57
3.1.4.	Ökotyp gebundene florale Reversion von <i>ibm1-12</i> Mutanten	60
3.1.5.	Die Rolle von <i>CAULIFLOWER</i> in der <i>IBM1</i> vermittelten Regulation der Meristemidentität	61
3.1.6.	Komplementation der <i>ibm1-12</i> Mutante	63
3.1.7.	Einfluss der enzymatischen Aktivität der JmjC Domäne von <i>IBM1</i> auf die Regulation der Meristemidentität.....	65
3.2.	Untersuchung der spatio-temporalen Expression von <i>IBM1</i>.....	68
3.2.1.	Expression des <i>IBM::IBM1-GUS</i> Reportertransgens.....	69
3.2.2.	Subzelluläre Lokalisation des <i>IBM1</i> Proteins.....	71
3.3.	Untersuchung von möglichen Zielgenen von <i>IBM1</i>	73
3.3.1.	Genomweite Untersuchung der Genexpression in <i>ibm1</i>	74
3.3.2.	Untersuchung der Expression von Meristemidentitätsgenen in <i>ibm1</i>	74
3.3.3.	Analyse der <i>FT</i> Promotoraktivität in <i>ibm1</i> durch Fusion mit β -Glucuronidase	79
3.3.4.	Die Rolle von <i>FT</i> bei der Regulation der Meristemidentität.....	82

3.4. Epigenetische Regulation von <i>FT</i> durch <i>IBM1</i>	85
3.4.1. <i>IBM1</i> vermittelte und <i>CMT3</i> -abhängige Regulation von floraler Meristemidentität und der <i>FT</i> -Expression	85
3.4.1.1. Die <i>cmt3</i> Mutation unterdrückt den Phänotyp von <i>ibm1-12</i> Mutanten	85
3.4.1.2. Analyse der Expression von <i>FT</i> in <i>ibm1-12 cmt3</i> Doppelmutanten	87
3.4.2. Untersuchung von DNA-Methylierung am <i>FT</i> -Locus	88
3.4.2.1. Methylierungsabhängige Restriktion der genomischen DNA mit <i>McrBC</i>	89
3.4.2.2. Bisulfit-Sequenzierung des <i>FT</i> -Promotors	91
3.4.3. Untersuchung von Histonmodifikationen am <i>FT</i> Locus	95
4. DISKUSSION	99
4.1. <i>IBM1</i> reguliert den Übergang zum Blühen in <i>A. thaliana</i>	100
4.1.1. Die Entwicklungsdefekte der Infloreszenz beruhen auf dem Funktionsverlust von <i>IBM1</i> und seiner JmjC Domäne	100
4.1.2. Repression von floralen Meristemidentitätsgenen in <i>ibm1</i> korreliert mit dem Phänotyp	101
4.1.3. Die <i>cal</i> Mutation verstärkt den <i>ibm1</i> Phänotyp	103
4.1.4. Regulation der floralen Meristemidentität durch <i>IBM1</i> offenbart eine erweiterte Funktion von <i>FT</i> und dessen gewebespezifische Regulation	104
4.1.5. Ein Modell von <i>FT</i> bei der Regulation der floralen Meristemidentität	106
4.2. <i>IBM1</i> reguliert die <i>FT</i>-Expression durch Unterdrückung von CHG-DNA-Methylierung und H3K9me2 am <i>FT</i>-Promotor	108
5. ANHANG	114
5.1. Kontrollen des α H3K9me2-Chip	115
5.2. <i>ibm1</i> -Microarray	116
5.3. Oligonukleotide	134
6. LITERATUR	136
ERKLÄRUNG	144
DANKSAGUNG	145

Abbildungsverzeichnis

Einleitung	
Abbildung 1.1: Prinzip der Aufrechterhaltung von DNA-Methylierung.....	5
Abbildung 1.2: Homologie der JmjC-Proteine in <i>A. thaliana</i>	9
Abbildung 1.3: Signalwege der genetischen Regulation der Blühinduktion von <i>A. thaliana</i>	16
Material und Methoden	
Abbildung 2.1: Skizze des Systems, nach dem transgene Individuen genotypisiert wurden.	34
Abbildung 2.2: Beispiel einer Genotypisierung.....	36
Abbildung 2.3: Ein erwartetes Ergebnis der Kontroll-PCR nach der Bisulfit-Konversion.....	41
Abbildung 2.4: Blau-Weiss-Selektion der Bisulfit-Klone.....	44
Ergebnisse	
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von <i>IBM1</i> und der verwendeten Allele.....	53
Abbildung 3.2: Der Phänotyp von <i>ibm1</i> Mutanten.....	55
Abbildung 3.3: Florale Reversion bei <i>ibm1-12</i> Mutanten.....	56
Abbildung 3.4: Entwicklung von Organen an der primären Sprossachse bei <i>ibm1</i> Mutanten.....	58
Abbildung 3.5: Anteil der transformierten FM bei <i>ibm1</i> Mutanten.....	59
Abbildung 3.6: <i>ibm1</i> Mutanten in den Ökotypen Col und Ler entwickeln keine transformierten FM.....	60
Abbildung 3.7: Die <i>cal-6</i> Mutation verstärkt den Phänotyp von <i>ibm1-5</i> Mutanten.....	62
Abbildung 3.8: Komplementation der <i>ibm1-12</i> Mutante.....	64
Abbildung 3.9: Sequenzhomologie der JmjC Domäne von IBM1 und des Orthologen humanen JHDM2A.....	65
Abbildung 3.10: Mutation der JmjC-Domäne von IBM1 führt zum <i>ibm1-12</i> -Phänotyp.....	66
Abbildung 3.11: Expressionsprofil von <i>IBM1::IBM1-GUS</i> im Wildtyp.....	70
Abbildung 3.12: Subzelluläre Lokalisation von IBM1-GFP.....	72
Abbildung 3.13: Oligonukleotid-Microarray von <i>ibm1-12</i> Mutanten.....	76
Abbildung 3.14: Ausgewählte in <i>ibm1-12</i> Mutanten runterregulierte Gene aus dem Microarray.....	76
Abbildung 3.15: Expression von Meristemidentitätsgenen in <i>ibm1</i> Mutanten.....	78
Abbildung 3.16: <i>FT</i> Promotoraktivität in <i>ibm1-12</i> (Ws) Mutanten.....	80
Abbildung 3.17: <i>FT</i> -Promotoraktivität in <i>ibm1-5</i> (Col) Mutanten.....	82
Abbildung 3.18: <i>ft-13</i> Mutanten mit floraler Reversion.....	83
Abbildung 3.19: Kreuzung von <i>ibm1-11</i> mit <i>ft-13</i>	84
Abbildung 3.20: Die <i>cmt3</i> Mutation unterdrückt den Phänotyp von <i>ibm1-12</i> Mutanten.....	86
Abbildung 3.21: Die <i>cmt3</i> Mutation unterdrückt die <i>FT</i> -Repression in <i>ibm1-12 cmt3</i> Hochblättern.....	87
Abbildung 3.22: Methylierungsabhängige Restriktion der DNA mit McrBC.....	89
Abbildung 3.23: Kontrolle der Bisulfit-Konversion.....	92
Abbildung 3.24: DNA-Methylierung am <i>FT</i> -Promotor in <i>ibm1-5</i> Mutanten.....	93
Abbildung 3.25: Typenspezifischer Vergleich der DNA-Methylierung in <i>ibm1-5</i> und Wildtyp.....	94
Abbildung 3.26: Interne Kontrolle des ChIP: Anreicherung von H3K9me2 bei <i>BNS</i> in <i>ibm1</i> Mutanten.....	96
Abbildung 3.26: Anreicherung von H3K9me2 am <i>FT</i> -Locus in <i>ibm1</i> Mutanten.....	97
Diskussion	
Abbildung 4.1: Modell zur Funktion von IBM1 bei der Regulation der floralen Meristemidentität.....	111
Anhang	
Abbildung 5.1: Qualitätskontrolle des α H3K9me2-ChIP.....	115
Abbildung 5.2: ChIP mit H3K9me2-Antikörpern von Hochblättern des Wildtyps und der <i>ibm1</i> Mutanten erster und zweiter homozygoten Generationen.....	115

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Purin-Base, Bestandteil eines Nukleotids)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaare
Col	Columbia, Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
C	Cytosin (Pyrimidin-Base, Bestandteil eines Nukleotids)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CaMV	Cauliflower-Mosaikvirus
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Col	Columbia, Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FM	florales Meristem
FMI	florale Meristemidentität
G	Guanin (Purin-Base, Bestandteil eines Nukleotids)
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	β-Glucuronidase
H	jede Base außer Guanin
H3K9me2	dimethyliertes Lysin an Position 9 des Histon 3
H3K27me3	trimethyliertes Lysin an Position 27 des Histon 3
IM	Infloreszenzmeristem
IP	Immunopräzipitation
JmjC	Jumonji C
kb	Kilobasenpaare
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i> , Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
mRNA	messenger RNA / Boten-RNA
PCR	Polymerasenkettenreaktion
RdDM	RNA-abhängige DNA-Methylierung
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasen-Kettenreaktion
SAM	Sprossapikalmeristem
T	Thymin (Pyrimidin-Base, Bestandteil eines Nukleotids)
T2	2. Generation von <i>A. thaliana</i> nach Transformation
Ws	Wassilewskija, Ökotyp von <i>A. thaliana</i>
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Differenzierung von Zellen zur Entwicklung von verschiedenen Organen in einem mehrzelligen Organismus erfordert die Etablierung von differentieller Genexpression und deren Aufrechterhaltung über Zellteilungen hinweg. Chromatin-Modifikationen können an assoziierten Genen die Expression positiv oder negativ regulieren, je nach dem, welche Modifikation vorliegt. Sie können an Tochterzellen vererbt werden und damit für die Aufrechterhaltung des Genexpressionsprofils und der Zellidentität sorgen. Diese Art der Genregulation und Vererbung wird als epigenetisch bezeichnet, da sie nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz basiert. Histon- und DNA-Methylierung an Genen, die Zellidentitäten regulieren, spielen bei vielen Differenzierungsprozessen eine essentielle Rolle. Eines der wichtigen Entwicklungsschritte im Lebenszyklus von *A. thaliana* ist die Blühinduktion, die eine Transformation des Sprossapikalmeristems, das eine Population von pflanzlichen Stammzellen beinhaltet und aufrechterhält, zur Entwicklung von Blüten bewirkt. IBM1 ist eine Histon-Demethylase, die Gene vor der ektopischen und mit Repression korrelierenden H3K9me2-(Dimethyl-Lysin 9 des Histon 3)-Modifikation und vor der DNA-Methylierung vom Typ CHG schützt, welche von der funktionell antagonistischen Histon-Methyltransferase *KYP* und DNA-Methyltransferase *CMT3* etabliert werden. Obwohl die beiden Chromatin-Modifikationen zum größten Teil im Heterochromatin kolokalisiert sind und für dessen transkriptionelle Inaktivierung sorgen, deutet der Phänotyp von *ibm1* Mutanten darauf hin, dass deren Exklusion auch im Euchromatin entwicklungsrelevant ist. In dieser Arbeit wurde die Regulation von floraler Meristemidentität untersucht, bei der IBM1 die Expression von Zielgenen durch Unterdrückung von H3K9me2 und DNA-Methylierung aufrechterhält. Diese Arbeit zeigt, dass *ibm1* Mutanten nach der Blühinduktion zur Entwicklung von chronologisch früheren Organen, z.B. Seitentrieben und Blättern, zurückkehren. Dies kann als florale Reversion interpretiert werden und kommt im Wildtyp nicht vor. Korrelierend mit dem Phänotyp, sind in *ibm1* Mutanten Gene reprimiert, die bei der Regulation der floralen Meristemidentität eine Rolle spielen und deren Mutanten mit *ibm1* vergleichbare Phänotypaspekte aufweisen. Im Zuge der Analyse der Genexpression wurde in *ibm1* eine gewebespezifische Repression des für die Blühinduktion und die Aufrechterhaltung des Blühens verantwortlichen Gens *FT* detektiert, dessen Expression in *ibm1 cmt3* Doppelmutanten wiederhergestellt wird. Zudem korreliert die Repression von *FT* mit ektopischer H3K9me2 und DNA-Methylierung vom Typ CHG am Promotor von *FT*. Zumal auch *ft-13* Mutanten vergleichbare Aspekte des *ibm1* Phänotyps aufweisen, schlägt diese Arbeit ein Modell vor, gemäß dem IBM1 *FT* durch Unterdrückung von H3K9me2 und der DNA-Methylierung gewebespezifisch aktiviert und damit für die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität sorgt.

Summary

In a multicellular organism, the differentiation of cells for the development of various organs requires the establishment of differential gene expression and its maintenance over cell divisions. Chromatin modifications at the associated genes can regulate positively or negatively their expression, which is dependent on the type of modification. They can be passed on to the daughter cells and thus ensure the maintenance of the gene expression profile and cell identity. This type of gene regulation and inheritance is called epigenetic, because it is not based on changes in the DNA sequence. Histone and DNA methylation of genes, that regulate cell identities, play an essential role in many differentiation processes. Floral induction is one of the most important developmental steps in the life cycle of *A. thaliana* that causes a transformation of the shoot apical meristem, which contains and maintains a population of plant stem cells, to bloom development. IBM1 is a histone demethylase, which protects genes from ectopic H3K9me2 (dimethyl-lysine 9 of histone 3) and DNA methylation of the CHG type established by the functional antagonistic histone methyltransferase KYP and DNA methyltransferase CMT3. Although the two chromatin modifications are largely co-localized in the heterochromatin and provide its transcriptional inactivation, the phenotype of *ibm1* mutants indicates that their exclusion in euchromatin is developmentally relevant as well. This work suggests that IBM1 regulates floral meristem identity through the exclusion of H3K9me2 and DNA methylation at target genes and thus by regulating their expression. It was also shown that *ibm1* mutants return to the development of chronologically earlier organs – side shoots, leaves – after floral induction. This can be interpreted as floral reversion and does not occur in the wildtype. In addition, genes that are responsible for the regulation of floral meristem identity are repressed in *ibm1* mutants. The mutants of these genes show comparable phenotype aspects to *ibm1* mutants. Furthermore, a tissue-specific repression of *FT* was detected in *ibm1* mutants, which is restored in *ibm1 cmt3* double mutants. *FT* is responsible for the floral induction and was also shown to be necessary for the maintenance of floral meristem identity. In addition, the repression of *FT* in *ibm1* mutants correlates with ectopic H3K9me2 and DNA methylation of the CHG type at the promoter of *FT*. Since *ft-13* mutants demonstrate similar aspects of the *ibm1* phenotype, this work suggests a model, in which IBM1 tissue-specifically enabled *FT* by suppression of H3K9me2 and DNA methylation at its locus and thus ensures the maintenance of floral meristem identity.

1. Einleitung

1.1. Epigenetik in der Entwicklung von Eukaryoten

Mehrzellige Organismen entwickeln sich aus einer einzelnen Zelle, die das Genom des späteren Organismus enthält. Im Laufe der Entwicklung werden unterschiedliche strukturelle und funktionelle Zell- und Gewebestrukturen gebildet. Die hierbei stattfindenden Differenzierungsprozesse erfordern die Etablierung von differenzieller, zelltypspezifischer Genexpression und deren Aufrechterhaltung über Zellteilungen hinweg. Epigenetische Kontrolle der Genregulation spielt in der Entwicklung von eukaryotischen Organismen eine essentielle Rolle. Da die Zellidentität eines Zellverbands in einem Gewebe über Zellteilungen hinweg aufrechterhalten werden soll, muss dessen Genexpressionsmuster ebenfalls mitotisch stabil vererbt werden können. Umfangreiche Analysen in den letzten Jahren konnten zeigen, dass die Aktivität von Genen nicht ausschließlich durch DNA-kodierte Sequenzen reguliert wird, sondern auf der Ebene der Histon- und DNA-Modifikationen erfolgen kann. Durch verschiedene kovalente Modifikationen des Chromatins, welche zum einen mitotisch stabil und zum anderen reversibel sind, können Genexpressionsprofile bzw. die neu erworbene Zellidentität mitotisch vererbt werden. Weil solche Differenzierungsprozesse nicht auf der Änderung der DNA-Sequenz basieren, werden sie als epigenetisch bezeichnet. Epigenetik befasst sich mit der Untersuchung von mitotisch und meiotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz erklärt werden können (Russo et al. 1996). Das Präfix *epi-* stammt aus der griechischen Sprache und besitzt bei dieser Anwendung die Bedeutung „über“. Epigenetik bezeichnet demnach eine Ebene der Vererbung über der Ebene der DNA-Sequenz.

1.1.1. Die Rolle von Histon-Modifikationen in der Entwicklung von Eukaryoten

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in Mitochondrien oder Chloroplasten zirkulär und im Zellkern – in gepackter Form, als Chromatin vor. Etwa 146 bp der DNA umwickeln ein Histonoktamer und entsprechen einer Nukleosomeinheit (Luger, K. et al. 1997). Die freiliegenden N-terminalen Aminosäuren von Histonproteinen tragen verschiedene posttranslationale Modifikationen. Viele epigenetische Regulationsprozesse finden durch kovalente Modifikationen an aminoterminalen Aminosäuren von Histonproteinen statt. Über die verschiedenen Arten der Methylierung an Lysinen des Histon 3 (H3) kann die Genexpression positiv oder negativ reguliert und der Chromatinzustand an den betroffenen genomischen Regionen beeinflusst werden. Die Methylierung am H3K9 (Lysin an Position 9 des Histon 3) und H3K27 (Lysin an Position 27 des Histon 3) korreliert mit negativer Regulation der Genexpression. Dagegen ist die Me-

thylierung an H3K4, H3K36 und H3K79 bevorzugt an Loci mit aktiver Genexpression zu finden (Lachner, M. et al. 2003, Martin, C. and Zhang, Y. 2005, Snowden, A. W. et al. 2002). Zudem ist beispielsweise die DNA- und H3K9-Methylierung für die Formation des Heterochromatins und transkriptionelle Stilllegung von Transposons und repetitiven Sequenzen erforderlich.

Die Bedeutung der epigenetischen Regulation für die Entwicklung in Eukaryoten zeigen Polycomb-Gruppen (Pc-G) Proteine, die durch den Besitz der katalytischen SET-Domäne Histon-Methyltransferase Aktivität mit H3K27me₃-Spezifität (trimethyliertes Lysin an Position 27 des Histon 3) besitzen (Kuzmichev, A. et al. 2002). Pc-G Proteine wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Lewis, E. B. 1978). Sie sind für die embryonale Entwicklung zuständig, indem sie homeotische Gene in Multiproteinkomplexen transkriptionell reprimieren (Francis, N. J. and Kingston, R. E. 2001, Muller, J. et al. 2002). Eines dieser Komplexe ist das Polycomb repressive complex 2 (PRC2), dessen Pc-G-Proteinkomponente ENHANCER OF ZESTE (E(z)) die katalytische SET-Domäne besitzt. In *Arabidopsis thaliana* ist der PRC2 konserviert, wobei es mehrere Homologe des *Drosophila* E(z) Proteins und der anderen Komponenten des PRC2 gibt (Pien, S. and Grossniklaus, U. 2007). Wegen der Redundanz der homologen Pc-G Proteine in *A. thaliana* sind starke Defekte in der Entwicklung erst bei Mehrfachmutanten zu beobachten. So kommt es bei *curly leaf/swinger* (*clf/swn*) Doppelmутanten, den Homologen von E(z), zu drastischen Defekten bei der Differenzierung. Nach der Keimung proliferieren die Individuen kallusartiges Gewebe, das nur in Zellkultur lebensfähig ist (Schubert, D. et al. 2006).

Bei Säugetieren findet die Differenzierung von Geweben und Organen während der embryonalen Phase statt. Postnatal beschränkt sich die Entwicklung auf das Wachstum, die Differenzierung ist dagegen weitgehend abgeschlossen. Während des Lebenszyklus von höheren Pflanzen werden ständig neue Organe gebildet (Rosettenblätter, Spross, Hochblätter, Seitentriebe, Blüten). Dies erfordert das Vorliegen eines Potenzials zur Neudifferenzierung. Pc-G-Proteine reprimieren gewebespezifisch Gene auf epigenetischer Ebene und sind so für die Determinierung des Zellschicksals essentiell (Guitton, A. E. and Berger, F. 2005). In *A. thaliana* reprimiert *CLF* durch die Katalyse von H3K27me₃ das blütenspezifisch exprimierte, homeotische Gen *AGAMOUS* (*AG*) in Blättern und reguliert damit die Zellidentität (Goodrich, J. et al. 1997). Der Verlust der *CLF*-Funktion resultiert im Verlust von H3K27me₃ und in ektopischer Expression von *AG* in Blättern und anderen Gewebe. Dies führt zu einem frühblühenden Phänotyp mit gekräuselten Blättern (Chanvivattana, Y. et al. 2004, Goodrich, J. et al. 1997, Schubert, D. et al. 2006)

1.1.2. Die Rolle der DNA-Methylierung in *A. thaliana*

DNA-Methylierung kommt sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. In Bakterien schützt sie indirekt vor Bakteriophagen, da fremde unmethylierte DNA von endogenen Restriktionsenzymen erkannt und geschnitten werden kann (Bestor, T. H. 1990). Aber auch auf anderen Wegen aufgenommene DNA wird dadurch erkannt. Sequenzhomologiestudien von DNA-Methyltransferasen hatten ergeben, dass die DNA-Methylierung in Eukaryoten aus den Prokaryoten evolviert ist (Bestor, T. H. 1990). Die essentielle Rolle der DNA-Methylierung in der Entwicklung von Eukaryoten demonstrieren experimentell herbeigeführte Verluste der DNA-Methylierung, welche bei Tieren zu embryonaler Lethalität führen. Hingegen sind Pflanzen widerstandsfähiger und überleben, entwickeln jedoch starke pleiotropische Phänotypen (Finnegan, E. J. et al. 1996). Genau diese Tatsache ermöglicht es, die Forschung der DNA-Methylierung an verschiedenen Pflanzenspezies voranzubringen.

Bei der DNA-Methylierung in Eukaryoten wird die Base Cytosin zu 5-Methylcytosin methyliert. DNA-Methylierung kann in drei verschiedenen Sequenzkontexten auftreten: in symmetrischen, CG und CHG, und im asymmetrischen, CHH, während H einem C, T oder A entspricht. In Säugetieren gibt es fast nur die CG-Methylierung, wobei etwa 70-80% aller CG-Sequenzen des Genoms methyliert sind (Ehrlich, M et al. 1982). Unmethylierte CG-Sequenzen sind in der Regel in der Nähe von Promotoren zu finden und werden als CpG-Inseln bezeichnet. Nur eine geringe Anzahl an der nicht-CG Methylierung kann in embryonalen Säugetierstammzellen beobachtet werden (Ramsahoye, B. H. et al. 2000). Dagegen sind in Pflanzen alle drei Typen der DNA-Methylierung zu finden. In *A. thaliana* sind genomweit ca. 24% der CG-Positionen, sowie 6,7% der CHG- und 1,7% der CHH-Positionen methyliert (Cokus, S. J. et al. 2008).

In den meisten Eukaryoten stellt die DNA-Methylierung einen zur DNA-Sequenz zusätzlichen Informationsträger dar, der Genexpression regulieren kann. Im Gegensatz zu Säugetieren, in deren Genom die DNA-Methylierung vergleichsweise gleichmäßig verteilt ist, findet man diese in Pflanzen an bestimmten, bevorzugten Regionen. Die drei DNA-Methylierungstypen sind überwiegend an Transposons, repetitiven DNA-Sequenzen und centromerischen Regionen lokalisiert und für deren transkriptionelle Inaktivierung verantwortlich (Zhang, X. et al. 2006). Die Verteilung der DNA-Methylierungstypen an Transposons und Genen ist unterschiedlich. Detaillierte DNA-Methylierungsanalysen haben gezeigt, dass auch die DNA von aktiven Genen spezifisch methyliert sein kann (Zhang, X. et al. 2006, Zilberman, D. et al. 2007). Während an heterochromatischen, transkriptionell stillgelegten DNA-Sequenzen alle drei Typen der DNA-Methylierung lokalisiert sind und Transposons auf deren gesamten Sequenz stark methyliert

sind, ist im Euchromatin überwiegend die CG-Methylierung zu finden. Bei etwa 30% exprimierter Gene ist die CG-Methylierung an den Transkriptionseinheiten zu finden (Cokus, S. J. et al. 2008, Lister, R. et al. 2008). Bei den DNA-Sequenzen von diesen Genen fällt die Konzentration der DNA-Methylierung von der Mitte des Gens, wo diese am höchsten ist, zu den 5'- und 3'-Enden hin ab (Gehring, M. and Henikoff, S. 2007). Auf der anderen Seite können einige Gene, die repetitive Sequenzen in deren Promotoren beinhalten, DNA-Methylierung aller drei Typen aufweisen, die mit H3K9me2-Modifikationen und transkriptioneller Inaktivierung assoziiert sind (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008, Cokus, S. J. et al. 2008).

Pflanzen mit reduzierter DNA-Methylierung zeigen starke morphologische Defekte. In *A. thaliana* ist die DNA-Methyltransferase *DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1)* für die Aufrechterhaltung der CG-Methylierung verantwortlich (Chan, S. W. et al. 2005, Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010). So resultiert die Mutation von *MET1* in *Arabidopsis* und *Nicotiana* in pleiotropischen Phänotypen, was die Rolle der DNA-Methylierung in verschiedenen regulatorischen Signalwegen unterstreicht (Finnegan, E. J. et al. 1996, Kankel, M. W. et al. 2003, Nakano, Y. et al. 2000, Xiao, W. et al. 2006). *met1* Mutanten entwickeln reduzierte apikale Dominanz, Kleinwuchs, Abnormitäten in der Blütenentwicklung, gekräuselte Blätter und Defekte in der Embryogenese und Entwicklung von Samen (Finnegan, E. J. et al. 1996). Das transkriptionell inaktive Heterochromatin trägt den größten Anteil der DNA-Methylierung, in *met1* Mutanten kommt es teilweise zur Reaktivierung von trasposablen Elementen (Deleris, A. et al. 2012, Mathieu, O. et al. 2005).

Etwa ein Drittel aller Gene in *A. thaliana* trägt CG-Methylierung im transkribierten Bereich. Jedoch ist die DNA-Methylierung an Genen, im Gegensatz zu Transposons, nicht zwingendermaßen für deren Inaktivierung zuständig. Viele methylierte Gene sind mäßig und in verschiedenen Geweben exprimiert (Zilberman, D. et al. 2007). Andererseits findet man in *met1* Mutanten bei stark und schwach exprimierten Genen Korrelationen zwischen der DNA-Methylierung im transkribierten Bereich und deren Transkription, was auf Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Transkription von Genen hinweisen könnte.

1.1.2.1. Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung

Man unterscheidet zwischen der Aufrechterhaltungs- und *de novo* DNA-Methylierung. Die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung erfolgt während der Replikation, indem die auf dem

Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010

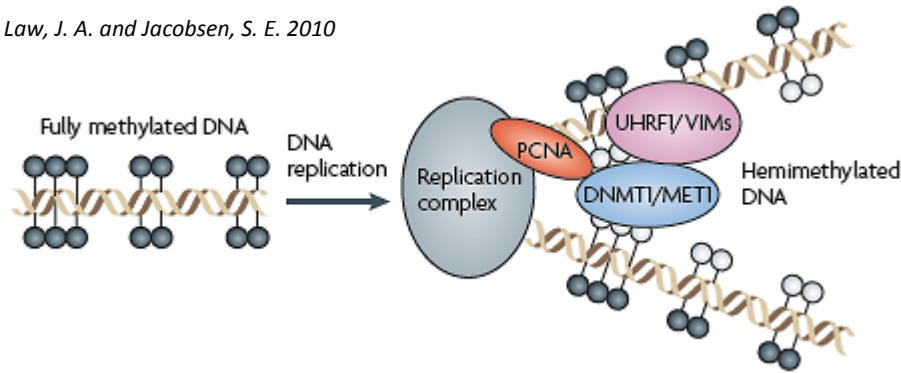


Abbildung 1.1: Prinzip der Aufrechterhaltung von DNA-Methylierung.

Schematische Darstellung des Replikationsprozesses in tierischen und pflanzlichen Zellen und der dabei stattfindenden mitotischen Vererbung der symmetrischen DNA-Methylierung. Das mit *MET1* interagierende *UHRF1* erkennt hemimethylierte DNA. Die entsprechenden Cytosine des neu synthetisierten DNA-Strangs werden durch *MET1* methyliert.

Elternstrang bereits vorhandene Methylierung am neu-synthetisierten DNA-Strang ergänzt wird. Die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung kann nur bei der symmetrischen CG- und CHG-Methylierung erfolgen. Die die DNA-Methylierung aufrechterhaltenden Proteine erkennen hemimethylierte DNA und methylieren die symmetrischen Cytosine des Tochterstrangs (Chan, S. W. et al. 2005, Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010). Für die *de novo* DNA-Methylierung, die von der Replikation unabhängig ist, werden *de novo* DNA-Methyltransferasen benötigt. In Säugtieren wird die DNA-Methylierung durch die DNA-Methyltransferase 3 (*DNMT3*) etabliert und durch die DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) aufrechterhalten (Goll, M. G. and Bestor, T. H. 2005, Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010). In Pflanzen erfolgt die Etablierung der DNA-Methylierung, sowohl bei CG, CHG als auch CHH, durch die *de novo* DNA-Methyltransferase *DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2* (*DRM2*), das das funktionelle Ortholog von *DNMT3* ist (Cao, X. et al. 2000). Die Aufrechterhaltung der CG-Methylierung erfolgt durch das *DNMT1*-Homolog *MET1*. Zusätzlich wird für die Vererbung der CG-Methylierung an die Tochterzellen das mit *DNMT1* interagierende *UHRF1* (*ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1*) benötigt, das an der Replikationsgabel die hemimethylierte DNA erkennt. Die gleiche Funktion wird von der *UHRF1*-orthologen *VARIANT IN METHYLATION- (VIM)*-Proteinfamilie in Pflanzen ausgeübt (Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010, Woo, H. R. et al. 2008). Die VIM-Proteine besitzen eine SRA-Domäne, die spezifisch hemimethylierte DNA erkennt und bindet. Weitere Studien haben gezeigt, dass *MET1* an manchen Loci auch für die *de novo* Methylierung von Genen verantwortlich sein könnte (Zubko, E. et al. 2012).

Die Aufrechterhaltung der CHG-Methylierung erfolgt Teil durch die pflanzenspezifischen DNA-Methyltransferasen *CHROMOMETHYLASE 3* (*CMT3*) und *CMT2* (Cao, X. and Jacobsen,

S. E. 2002a, Stroud, H. et al. 2014). Diese findet in engem Zusammenspiel mit der H3K9 Histon-Methyltransferase *KRYPTONITE* (*KYP*) statt. Schon bevor Einzelheiten dieser Wechselbeziehung bekannt wurden, konnten umfangreiche Analysen des Epigenoms von *A. thaliana* zeigen, dass die CHG-Methylierung und H3K9me2 im hohen Maße korrelieren (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). Eine starke Reduktion der CHG-Methylierung konnte sowohl in *cmt3* als auch in *kyp* Mutanten festgestellt werden. Die Proteinstrukturanalyse beider Proteine legt nahe, dass die CHG-Methylierung und H3K9me2 in einem Rückkopplungsmechanismus aufrechterhalten werden (Johnson, L. M. et al. 2007). CMT-Proteine besitzen außer der DNA-Methyltransferase-Domäne eine Chromo-Domäne, die methylierte Histon-Proteinketten binden kann. *KYP*, wiederum, enthält außer der Histon-Methyltransferase-Domäne eine SRA-Domäne, die methylierte Cytosine binden kann. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das Modell der gegenseitigen Ausrechterhaltung von H3K9me2 und der CHG-Methylierung entwickelt (Johnson, L. M. et al. 2007).

Obwohl *MET1* für die Aufrechterhaltung der CG-Methylierung verantwortlich ist, haben in den letzten Jahren durchgeführte genomweite Analysen der DNA-Methylierung gezeigt, dass der Verlust der CG-Methylierung in *met1* Mutanten von ektopischer CHG-Methylierung und mit ihr verknüpfter H3K9me2 an hunderten von Genen begleitet wird (Jacobsen, S. E. et al. 2000, Jacobsen, S. E. and Meyerowitz, E. M. 1997, Lister, R. et al. 2008). *IBM1* ist eine H3K9me2-spezifische Histon-Demethylase, die codierende Sequenzen von Genen vor den ektopischen H3K9me2 und CHG-Methylierung schützt (Miura, A. et al. 2009, Saze, H. et al. 2008a). Interessanterweise konnte in einer Arbeit zur Analyse von aberranten DNA-Methylierungsmustern in *ibm1* und *met1* Mutanten gezeigt werden, dass Gene mit ektopischer CHG-Methylierung in *met1* Mutanten und Gene, die in *ibm1* Mutanten ektopische CHG-Methylierung tragen, eine hohe gemeinsame Schnittmenge besitzen (Rigal, M. et al. 2012). Die Aufklärung dieser Korrelation lieferten Analysen des Methylierungszustands und der Expression von *IBM1* in *met1* Mutanten. Eines der Introns von *IBM1* trägt im Wildtyp CG-Methylierung (Rigal, M. et al. 2012). Diese Methylierung von *IBM1*, die in *met1* Mutanten verringert ist, wird für die Expression von *IBM1* benötigt. Somit scheint *MET1* Gene durch CG-Methylierung vor ektopischer CHG-Methylierung zu schützen, indem es *IBM1* positiv reguliert. Eine andere Arbeit widerspricht jedoch dem Ergebnis, dass sich die ektopische Methylierung tragenden Gene in *ibm1* und *met1* Mutanten stark überschneiden (Deleris, A. et al. 2012). Hierbei wurde eine gemeinsame Schnittmenge von nur knapp über 100 Genen ermittelt. Somit bleibt die Funktionsweise der Regulation der CHG-Methylierung durch *MET1* an Genen noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.1.2.2. *De novo* DNA-Methylierung in *A. thaliana*

Die CHH-Methylierung wird durch die *de novo* DNA-Methyltransferase *DRM2* und *CMT2* im RNA-abhängigen DNA-Methylierungs- (englisch: RNA-directed DNA methylation, RdDM) Mechanismus aufrechterhalten (Cao, X. and Jacobsen, S. E. 2002b, Stroud, H. et al. 2014). Anders als die symmetrischen CG- und CHG-Methylierungen, die als hemimethylierte DNA während der Replikation erkannt und aufrechterhalten werden können, erfordert die CHH-Methylierung, welcher der Symmetrienaspekt fehlt, ein aktives Rekrutieren der DNA-Methyltransferase nach jeder Zellteilung. Der RdDM-Mechanismus ist für die *de novo* DNA-Methylierung in allen Sequenzkontexten zuständig. In den letzten Jahren konnten viele seiner Komponenten identifiziert und funktionell zugeordnet werden, so dass gegenwärtig bereits ein relativ detailliertes Modell des RdDM-Mechanismus besteht. Dennoch bleiben noch einige Fragen bezüglich bestimmter Zwischenschritte offen.

Wie die Bezeichnung bereits ankündigt, beruht die *de novo* DNA-Methylierung durch RdDM auf der Produktion von RNA. Bei unterschiedlichen Zwischenschritten des RdDM werden die pflanzenspezifischen RNA-Polymerasen IV (Pol IV) und V (Pol V) benötigt, um die verschiedenen RNA-Zwischenstufen zu erzeugen. Nach dem heutigen Modell werden die Transposons und repetetive Sequenzen durch die Pol IV transkribiert. Die ssRNA (englisch: single stranded RNA, einzelsträngige RNA) dient weiter als Matrize für die RNA-abhängige RNA-Polymerase 2 (englisch: RNA DIRECTED RNA POLYMERASE 2, (*RDR2*)) für die Produktion der doppelsträngigen RNA (dsRNA), welche von DICER-LIKE 3 (DCL3) zu 24-nukleotidlangen RNA-Produkten, *small interfering RNAs* (siRNA), geschnitten wird. Danach wird die siRNA durch die RNA-Methyltransferase HEN1 methyliert und von ARGONAUTE 4 (AGO4) gebunden. Über das GW/WG-Motiv der großen Untereinheit von Pol V, NRPE1, wird AGO4 gebunden. Die gebundene siRNA dirigiert AGO4 und die mit ihm assoziierten Proteine zu homologen DNA-Sequenzen, welche von *DRM2* methyliert werden (Law, J. A. and Jacobsen, S. E. 2010).

1.1.3. Die Rolle von Histon-Demethylasen in der Entwicklung von *A. thaliana*

Der Methylierungszustand von Histonproteinen resultiert aus dem Entgegenwirken von Histonmethyltransferasen und -demethylasen. Die Histon-Methylierung ist chemisch stabil und galt bis vor 2004 als irreversibel, bevor mit *LYSINE SPECIFIC DEMETHYLASE 1* (*LSD1*) die erste Histon-Demethylase mit H3K4me2/1-Spezifität entdeckt wurde (Shi, Y. et al. 2004). Mit *LSD1* sind in *A. thaliana* vier orthologe Proteine konserviert, die in der *LSD1*-Proteinfamilie zusam-

mengefasst werden. Die Histon-Demethylierung in dieser Proteinfamilie erfolgt durch eine amino-oxidative Reaktion, bei der FAD benötigt wird und als Seitenprodukt Formaldehyd entsteht. Obwohl *LSD1* hohe Sequenzhomologie zu gängigen am Metabolismus beteiligten Amino-oxidasen aufweist, unterscheidet es sich von ihnen durch den Besitz der SWIRM-Domäne, welche in einigen Proteinen zu finden ist, die Chromatinstruktur regulieren (Aravind, L. and Iyer, L. M. 2002). Nach dem Reaktionsmechanismus von LSD1-Proteinen können jedoch nur Mono- und Dimethylgruppen von Histonproteinen entfernt werden. Die zweite und größere Klasse von Histon-Demethylasen ist die Jumonji-Familie, der die katalytische Jumonji C (JmjC) Domäne mit Histon-Demethylase-Aktivität ihren Namen verleiht (Tsukada, Y. et al. 2006). Im Gegensatz zur LSD1-Familie können JmjC-Proteine nicht nur Mono- und Dimethylierung, sondern auch Trimethylierung umsetzen. Die JmjC Domäne ist in Eukaryoten konserviert und katalysiert Histon-Demethylierung durch eine oxidative Reaktion, die die Kofaktoren α -Ketoglutarat und Fe(II) benötigt und Formaldehyd und Succinat als Seitenprodukte produziert. Die JmjC-Histon-Demethylasen verschiedener Modellorganismen wurden nach Proteinsequenzhomologie und Domänenarchitektur in sieben (Klose, R. J. et al. 2006) bzw. acht (Lu, F. et al. 2008) Gruppen eingeteilt.

1.1.3.1. Zwei Klassen der Histon-Demethylasen regulieren die Blühinduktion

Die LSD1-Homologen *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *LSD1-LIKE1 (LDL1)* und *LSD1-LIKE2 (LDL2)* sind in die Kontrolle der Blühinduktion involviert und weisen untereinander hohe Sequenzhomologien auf (Jiang, D. et al. 2007). Als Teil des autonomen Blühregulationssignalwegs ist *FLD* an der Regulierung der Blühinduktion beteiligt (He, Y. et al. 2003). Im autonomen Blühregulationssignalweg, der unabhängig von der Vernalisation und Photoperiode ist, wird die Blühinduktion durch die Repression des MADS-box Transkriptionsfaktors *FLC* erreicht, der seinerseits das Blühen unterdrückt. Als *FLC*-Repressor ist *FLD* Teil dieses Regulationssystems. *fld* Mutanten sind unter Langtag-Bedingungen spätblühend, was vermutlich durch eine Anreicherung der aktivierenden H3K4me2 am *FLC* Locus und die daraus resultierende Missexpression von *FLC* zustande kommt. Im somatischen Gewebe reprimieren *LDL1* und *LDL2* das nur im weiblichen Gametophyt und Endosperm exprimierte *FWA* (Soppe, W. J. et al. 2000). Die ektopische Expression von *FWA* in *ldl2* Mutanten resultiert im spätblühenden Phänotyp. Die Redundanz von *LDL1* und *LDL2* zeigt sich dadurch, dass die *ldl1* Mutanten keinen Phänotyp haben und die *ldl1 ldl2* Doppelmutanten später als die *ldl2* Mutanten blühen. In partieller Redundanz mit *FLD* reprimieren *LDL1* und *LDL2* auch *FLC*. Der spätblühende Phänotyp von *ldl1 ldl2* Doppelmutanten beruht also zum Teil auf der Aktivierung von *FLC*.

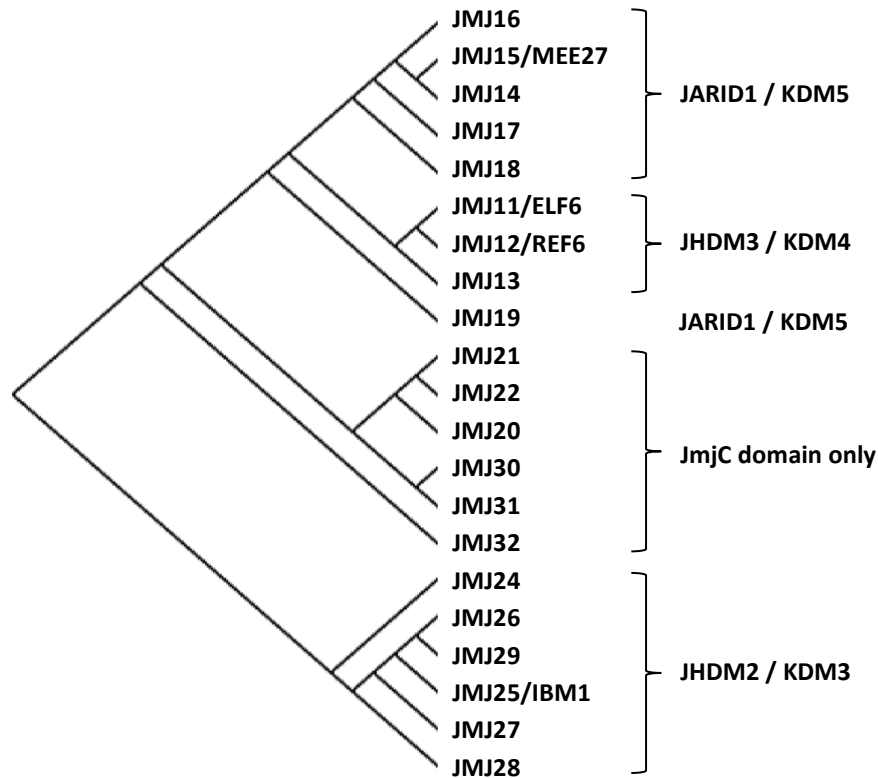


Abbildung 1.2: Homologie der JmjC-Proteine in *A. thaliana*.

Für die Homologie-Analyse der JmjC-Proteine in *A. thaliana* wurden die Aminosäuresequenzen von JmjC-Domänen zugrunde genommen. In *A. thaliana* sind vier von acht Proteingruppen der JmjC-Proteine in Säugetieren konserviert (Klose, R. J. et al. 2006, Lu, F. et al. 2008, Zhou, X. and Ma, H. 2008)

In Säugetieren wurden die JmjC-Domäne beinhaltenden Proteine anhand ihrer Domänenarchitektur und Aminosäuresequenz in acht Gruppen eingeteilt (Klose, R. J. et al. 2006). In *A. thaliana* sind 21 JmjC-Proteine konserviert. Es finden sich unter diesen Orthologe von vier Proteingruppen (Abbildung 1.2). Nur sechs JmjC-Proteine wurden bis zum heutigen Zeitpunkt charakterisiert, von denen vier in der Regulation der Blühinduktion involviert sind. *EARLY FLOWERING 6 (ELF6)* operiert im photoperiodischen Regulationsmechanismus der Blühinduktion als Repressor, daher sind die *elf6* Mutanten frühblühend (Noh, B. et al. 2004). Sein Homolog *REALTIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)* reprimiert den floralen Repressor *FLC* und fungiert damit als Aktivator des Blühens. Darüber hinaus sind die JHDM3-Orthologen in *A. thaliana* *ELF6* und *REF6* in der brassinosteroidvermittelten Regulation der Genexpression involviert (Yu, X. et al. 2008). Beide Proteine binden an den Transkriptionsfaktor BES1, welcher das Brassinosteroidsignal durch die Regulation der Expression von Zielgenen umsetzt. Bereits am Beispiel dieser zwei JmjC-Proteine wird die Bedeutung der JmjC-Proteine in verschiedenen Regulationsprozessen in der Entwicklung offensichtlich. Umso mehr konnte diese Erkenntnis gefestigt werden, nachdem *REF6* als erste und in Pflanzen bislang einzige

H3K27me3-spezifische Histon-Demethylase identifiziert wurde (Lu, F. et al. 2011). Obwohl H3K27me3-Demethylierung sowohl in Tieren als auch in Pflanzen konserviert ist, so erfolgt sie durch Enzyme unterschiedlicher Proteingruppen. Das tierische Ortholog von *REF6* ist die Histon-Demethylase *JHDM3* mit H3K9-/H3K36-Spezifität. Außerdem sind in Pflanzen keine UTX-orthologen JmjC-Proteine konserviert, wenngleich *UTX* eine H3K27me3-spezifische Histon-Demethylase in Tieren ist (Agger, K. et al. 2007). Zwei weitere JmjC-Proteine der JARID1-Gruppe regulieren ebenfalls den Blühzeitpunkt von *A. thaliana*. *JMJ18* ist eine aktive Histon-Demethylase mit H3K4me3/2-Spezifität, die die Blühinduktion positiv reguliert, indem sie den floralen Repressor *FLC* durch Entfernen der mit aktiver Genexpression korrelierenden H3K4me3-Modifikation reprimiert (Yang, H. et al. 2012). In Redundanz mit *ELF6* übt ein weiteres Ortholog der JARID1-Gruppe, *JMJ14*, eine entgegengesetzte Wirkung auf die Blühinduktion aus, indem ein zentraler Aktivator des Blühens und gleichzeitig mobiles Signal, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, durch Demethylierung von H3K4me3/2 reprimiert wird (Jeong, J. H. et al. 2009).

1.1.3.2. Beziehung von Histon-Demethylasen und der DNA-Methylierung

Verschiedene Modifikationen des Chromatins können mit positiver oder negativer Genregulation korrelieren. Schon vor einigen Jahren haben genomweite Studien des Epigenoms von *A. thaliana* gezeigt, dass die H3K9me2 Modifikation mit der CHG-Methylierung der DNA grundsätzlich korreliert (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). Beide epigenetischen Modifikationen sind im transkriptionell inaktiven Heterochromatin zu finden und sorgen durch die H3K9me2-spezifische Histon-Methyltransferase *KYP* und die DNA-Methyltransferase *CMT3* für die gegenseitige Aufrechterhaltung (s. Kapitel 1.1.2.1). Jüngere Studien nach Histon-Demethylase-Mutanten mit verringerter DNA-Methylierung offenbarten eine weitere Wechselwirkung zwischen Histon- und DNA-Methylierung, nach dem die Demethylierung von H3K4me3 für die Propagation der asymmetrischen DNA-Methylierung benötigt wird (Deleris, A. et al. 2010, Searle, I. R. et al. 2010). Die Mutanten der Histon-Demethylase *JMJ14* weisen ektopische H3K4me3 und einen Verlust von DNA-Methylierung an reaktivierten Loci auf, bei denen es sich hauptsächlich um transposable Elemente und repetitive Sequenzen handelt, die spezifischen Zielen des RdDM-Mechanismus entsprechen (Deleris, A. et al. 2010). Allerdings konnte durch die Transformation von RdDM-regulierten Transgenen gezeigt werden, dass *JMJ14* keine Rolle bei der *de novo* DNA-Methylierung durch RdDM spielt. Analysen zur Epistasie implizieren, *JMJ14* agiere unabhängig von der siRNA-Produktion und Prozessierung, jedoch sei für die Aufrechterhaltung der CHH-Methylierung durch *DRM2* notwendig. Diese Ergebnisse offenbarten zugleich einen von der *de novo* DNA-Methylierung distinkten Mechanismus zur Aufrechterhal-

tung der asymmetrischen DNA-Methylierung durch *DRM2*, bei dem die Histon-Demethylierung von H3K4me3 durch *JMJ14* eine entscheidende Rolle spielt.

Den Studien nach Mutanten mit verringerter DNA-Methylierung gingen andere, nach Mutanten mit ektopischer DNA-Methylierung, voran. Auch hierbei konnte ein JmjC-Protein identifiziert werden, das zugleich dem Forschungsobjekt dieser Arbeit entspricht. *INCREASE IN BONSAI METHYLATION 1* (*IBM1*, *JMJ25*) ist eine Histon-Demethylase mit H3K9me2-Demethylase-Aktivität, deren tierisches Ortholog *JHDM2A* ist (Saze, H. et al. 2008a, Yamane, K. et al. 2006). Namensgebend für die Histon-Demethylase ist der molekulare Phänotyp deren Verlustmutante. In *ibm1* Mutanten findet eine Ausbreitung von H3K9me2 und der DNA-Methylierung vom heterochromatischen *LINE*-Element auf den benachbarten euchromatischen Locus *BONSAI* (*BNS*) statt. Ursprünglich wurde die *bns* Mutation im *ddm1*-mutanten Hintergrund entdeckt (Saze, H. and Kakutani, T. 2007). Nach mehrfacher Selbstung von *ddm1* Mutanten ist ektopische DNA-Methylierung am *BNS*-Locus zu finden, die selbst nach der Rückkreuzung erhalten bleibt. Diese epigenetische *bns* Mutation resultiert in einem Phänotyp, der von Mutanten mit Transfer-DNA (T-DNA)-Insertionen in *BNS* reproduzierbar ist.

In der Tat weisen *ibm1* Mutanten einige Elemente (Verlust der apikalen Dominanz, Kleinwuchs) des *bns*-Phänotyps auf (Saze, H. et al. 2008b). Die *ibm1* Mutanten entwickeln weitere morphologische Phänotypen, die jedoch erst in der F₃-Generation offensichtlich werden, also in der zweiten homozygoten Generation (Saze, H. et al. 2008c). Die *ibm1* Mutanten produzieren kleine, schmale Blätter und weisen arretierte Blütenentwicklung und reduzierte Fertilität auf. Epigenetische Analysen zeigen, dass in *ibm1* Mutanten hunderte von transkribierten Genen ektopische H3K9me2 und CHG-Methylierung tragen. Im Umkehrschluss ergibt sich für die Funktion von *IBM1*, transkribierte Gene vor CHG-Methylierung und H3K9me2 zu schützen. Charakteristisch für Gene, die durch *IBM1* vor ektopischer Methylierung geschützt werden, sind deren Konstitution und das Expressionsprofil. In der Regel befinden sich unter den von *IBM1* regulierten Genen solche, die konstitutiv und nicht gewebespezifisch exprimiert sind (Inagaki, S. et al. 2010). Die Rolle des Ausschlusses von CHG-Methylierung und H3K9me2 von Genen ist nicht geklärt. Im Wildtyp von *A. thaliana* ist die CHG-Methylierung fast ausschließlich im Heterochromatin zu finden und kaum im Euchromatin. Desweiteren zeigen Expressionsanalysen von *IBM1*-Zielgenen in *ibm1* Mutanten, dass die ektopische Methylierung an Genen nicht zwingend zu deren Reprimierung führt. Die Expression einiger der in *ibm1* Mutanten ektopisch methylierten Gene ist reduziert, während die Expression anderer methylierter Gene unverändert oder gar erhöht ist (Miura, A. et al. 2009). Da jedoch der *ibm1* Phänotyp durch die *cmt3* Mutati-

on vollständig unterdrückt wird, ist es naheliegend, dass der Phänotyp durch ektopische CHG-Methylierung in *ibm1* Mutanten zustande kommt.

Für die Rolle von *IBM1* bei der Demethylierung von transkribierten Genen wurden Hypothesen aufgestellt (Miura, A. et al. 2009, Zilberman, D. et al. 2007). Bei großen Genen, und damit länger andauernder Transkription eines Gens, liegt das Chromatin dekondensiert vor und kann besonders an Stellen, an denen die Transkriptionsmaschinerie die DNA passiert, anfällig für die Transkription durch kryptische Promotoren werden. Diese produzieren aberrante Transkripte, die via RdDM die Methylierung der DNA bewirken. Es ist vorstellbar, dass besonders bei langen Genen mit andauernder Transkription die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von kryptischen Promotoren ansteigt. In diesem Kontext würde IBM1 durch Demethylierung für die Aufrechterhaltung des transkriptionell aktiven Zustands der Gene sorgen. Diese Hypothese unterstützen weitere Ergebnisse, die eine Rekrutierung von IBM1 zu reaktivierten Transposons zeigen (Inagaki, S. et al. 2010). Chromatinanalysen von *ibm1* Mutanten ergaben, dass stillgelegte Transposons von *IBM1* nicht reguliert werden (Miura, A. et al. 2009). Kommt es jedoch zu deren Reaktivierung, wie beispielsweise in *kyp* und *cmt3* Mutanten, die einen Verlust von H3K9me2 an Transposons bewirken, wird H3K9me2 in *ibm1 kyp* und *ibm1 cmt3* Doppelmutanten wiederhergestellt (Inagaki, S. et al. 2010).

1.2. Blühinduktion und Aufrechterhaltung des Blühens in *A. thaliana*

Der Lebenszyklus von *A. thaliana* umfasst die vegetative und reproduktive Entwicklung. Im Laufe beider Entwicklungsstadien werden kontinuierlich neue Organe gebildet: Blätter, Spross, Seitentriebe, Blüten. Die Bildung von neuem Gewebe erfordert neben Zellteilung ein Differenzierungspotenzial von Zellen. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen Zellbereiche etabliert, die eine begrenzte Anzahl an undifferenzierten Zellen beherbergen. Diese werden als Meristeme bezeichnet. Ein *A. thaliana* Keimling besitzt zwei Meristeme: das Wurzelmeristem und das Sprossapikalmeristem (SAM). Die Zellpopulationen von Meristemen erfüllen zwei wichtige Funktionen: zum einen, die Bildung von Organprimordien und zum anderen, deren Selbsterhaltung, um somit die erste Funktion dauerhaft erbringen zu können.

Der Übergang zum reproduktiven Wachstum markiert einen der wichtigsten Entwicklungsschritte von Pflanzen, der den Reproduktionserfolg bestimmt und dessen Einleitung durch die Veränderung der SAM-Identität reguliert wird. In der vegetativen Phase der Entwicklung produziert das SAM ausschließlich Rosettenblätter und, in deren Achseln, sekundäre Meristeme. Zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung, der durch das Zusammenspiel von inneren und äußeren Faktoren bestimmt wird, findet die Blühinduktion statt. Dieser Entwicklungsschritt erfordert die Transformation des vegetativen SAM zum Infloreszenzmeristem (IM) und die stabile Aufrechterhaltung der Meristemidentität. Im weiteren Entwicklungsverlauf produziert das IM lateral nur florale Meristeme (FM), die die Blüten bilden.

1.2.1. Das Entwicklungsprogramm des Sprossapikalmeristems

Alle während des Lebenszyklus von höheren Pflanzen neu gebildeten oberirdischen Organe werden postembryonal vom SAM produziert. In der vegetativen Entwicklungsphase wird eine durch deren Dauer bestimmte Anzahl an Rosettenblättern und lateralen Meristemen entwickelt. Nach Erreichen der durch ein Netzwerk von Signalwegen regulierten Blühinduktion wird das vegetative SAM morphologisch transformiert in ein IM, das lateral FMs produziert. Der Übergang zur reproduktiven Entwicklung wird neben der morphologischen Veränderung des vegetativen SAM zum IM auch von vielen physiologischen Veränderungen begleitet. Es finden Beschleunigung der Zellteilung im Apex und Verlängerung des Stiels statt, an dem durch die Regulation von Meristemidentitätsgenen nur noch Blüten anstatt von sekundären Infloreszenzen gebildet werden (Steeves and Sussex, 1989).

Der Spross von *A. thaliana*, wie auch von allen höheren Pflanzen, ist aus einer Abfolge von Metameren, den Phytomeren aufgebaut. Ein Phytomer besteht aus einem Nodium (Latein: Knoten) und einem Internodium, dem mit dem nächsten Nodium verbindenden Teil der Sprossachse. Jedes Nodium ist aus einem Tragblatt und einem lateralen Meristem, das in der Achsel des Tragblatts angelegt wird, zusammengesetzt. Die am Spross gebildeten Meristeme werden spiralförmig, lateral an der Sprossachse entlang ausgebildet. Ein Tragblatt kann in Abhängigkeit von der SAM-Identität zu einem Rosettenblatt oder Hochblatt differenzieren. Im vegetativen Stadium von *A. thaliana* wachsen die Tragblätter zu Rosettenblättern aus, die Internodien sind komprimiert und die Entwicklung axillärer Meristeme verzögert, wodurch der Pflanze die charakteristische Rosettenform verliehen wird. Die nach der Blühinduktion entwickelten Tragblätter wachsen zu Hochblättern aus, in deren Achseln die lateralen Meristeme sekundäre Infloreszenzen produzieren. Diese Organanordnung ist für ein sekundäres IM in *A. thaliana* charakteristisch. Außerdem kommt es zur Verlängerung von neu gebildeten Internodien.

Ein sekundäres IM ist, wie das primäre IM, ein indeterminiertes Meristem, das das Entwicklungsprogramm eines primären IM wiederholt. Ein IM differenziert bis zum Generationsende normalerweise nicht voll aus, d.h. ist indeterminiert. Die meristematische Zellpopulation eines IM wird ständig aufrechterhalten und, wenn in *A. thaliana* nicht Seneszenz einsetzen würde, produziert ständig neue Organe. Die Transformation des vegetativen SAM zum IM ist jedoch nur der erste Zwischenschritt in der Identitätsbestimmung des Meristems. Im zweiten Transformationsereignis wird das IM unwiderruflich zur Produktion von lateralen Blüten bildenden FM umprogrammiert. Im Gegensatz zum IM ist ein FM ein determiniertes Meristem, dessen meristematische Zellpopulation nach der Entwicklung der Blüte aufgebraucht wird.

1.2.2. Histologischer Hintergrund zur Organbildung am Spross

Die Produktion von Organen an der Infloreszenz erfolgt durch die lateralen axillären Meristeme. Die Anlagen der sekundären IM entwickeln sich normalerweise in den Achseln der Tragblätter. Obendrein hängt die Entwicklung axillärer Meristeme von der korrekten Entwicklung der unterstehenden Blätter ab (McConnell, J. R. and Barton, M. K. 1998). Beispielsweise hat die *phb-1d* Mutation in *Arabidopsis phabulosa* die Umkehrung der Blattpolarität zur Folge, sodass sich adaxiale Blattstrukturen auf der abaxialen Seite bilden und umgekehrt. Desweiteren ist in *phabulosa* Mutanten die Bildung von ektopischen Meristemen an der Unterseite der Blätter zu beobachten. Demnach ist die Entwicklung von axillären Meristemen mit der Entwicklung der Blätter eng miteinander verknüpft (McConnell, J. R. and Barton, M. K. 1998).

Die Entwicklung der lateralen Meristeme nach dem Auslösen der Blühinduktion unterscheidet sich von deren Produktion im vegetativen Stadium (Long, J. and Barton, M. K. 2000). Im letzteren Fall bilden sich die axillären Meristeme zuerst in den Achseln der ältesten, voll entwickelten Rosettenblätter und erst später an jüngeren Blättern (Grbic, B. and Bleecker, A. B. 1996). Diese Reihenfolge ändert sich grundlegend nach der Blühinduktion. Ab dem Zeitpunkt der erfolgten Vermittlung des Blühsignals werden laterale Meristeme zuerst in Achseln der jüngsten Blättern gebildet, die durch verlängerte Internodien der primären Sprossachse getrennt und als Stengelblätter bzw. Hochblätter bezeichnet werden (Hempel and Feldman, 1994). Demnach kommt es nach der Blühinduktion zu einer Umkehrung der Prioritäten bei der Entwicklung von Blättern und axillären Meristemen. Während im vegetativen Stadium axilläre Meristeme erst bei alten Rosettenblättern zu finden sind, zeigen *in situ* Hybridisierungsanalysen mit der Probe gegen die mRNA des Meristemmarkergens *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, dass die lateralen Meristeme bereits bei noch unentwickelten Hochblättern produziert werden. Die Initiierung der Entwicklung axillärer Meristeme scheint die Entwicklung der Blätter teilweise zu inhibieren (Long, J. and Barton, M. K. 2000).

Nach der Entwicklung von sekundären Infloreszenzen mit unterstehenden Hochblättern findet sprossaufwärts ausschließlich die Produktion von Blüten statt. Anders als bei lateralen Sprossachsen werden in *A. thaliana* Blüten ohne unterstehendes Blatt produziert. Erst die histologischen und Expressionsanalysen von gewebespezifischen Markergenen führten zur Erkenntnis, dass die Entwicklungen von axillären Meristemen und FM sehr ähnlich sind. *In situ* Hybridisierungsanalysen mit Proben gegen *AINTEGUMENTA (ANT)*, das in Blattprimordien und gleichzeitig komplementär zu *STM* exprimiert ist, zeigen, dass sich das FM auf der molekularen Ebene, ähnlich zum axillären Meristem, in der Achsel des Primordiums eines Tragblatts entwickelt, welches jedoch rudimentär bleibt. Demnach handelt es sich bei einem FM ebenfalls um ein axilläres Meristem. Das FM besitzt allerdings kein unterstehendes Hochblatt und, im Gegensatz zum IM, eine determinierte Meristemidentität (Long, J. and Barton, M. K. 2000).

1.2.3. Genetische Signalwege der Blühinduktion

Die Blühinduktion wird durch verschiedene genetische Regulationsmechanismen gesteuert. Durch genetische Studien konnten einige der regulatorischen Signalwege der Blühinduktion, die beteiligten Gene und die Blühinduktion vermittelnden Signale identifiziert werden (Abbildung 1.3, (Corbesier, L. and Coupland, G. 2006)). Zu den wesentlichen Regulationsmechanismen zählen der photoperiodische, der Vernalisations-, der autonome und der Gibberelin-Regulationsmechanismus. Beim photoperiodischen Regulationsmechanismus werden die In-

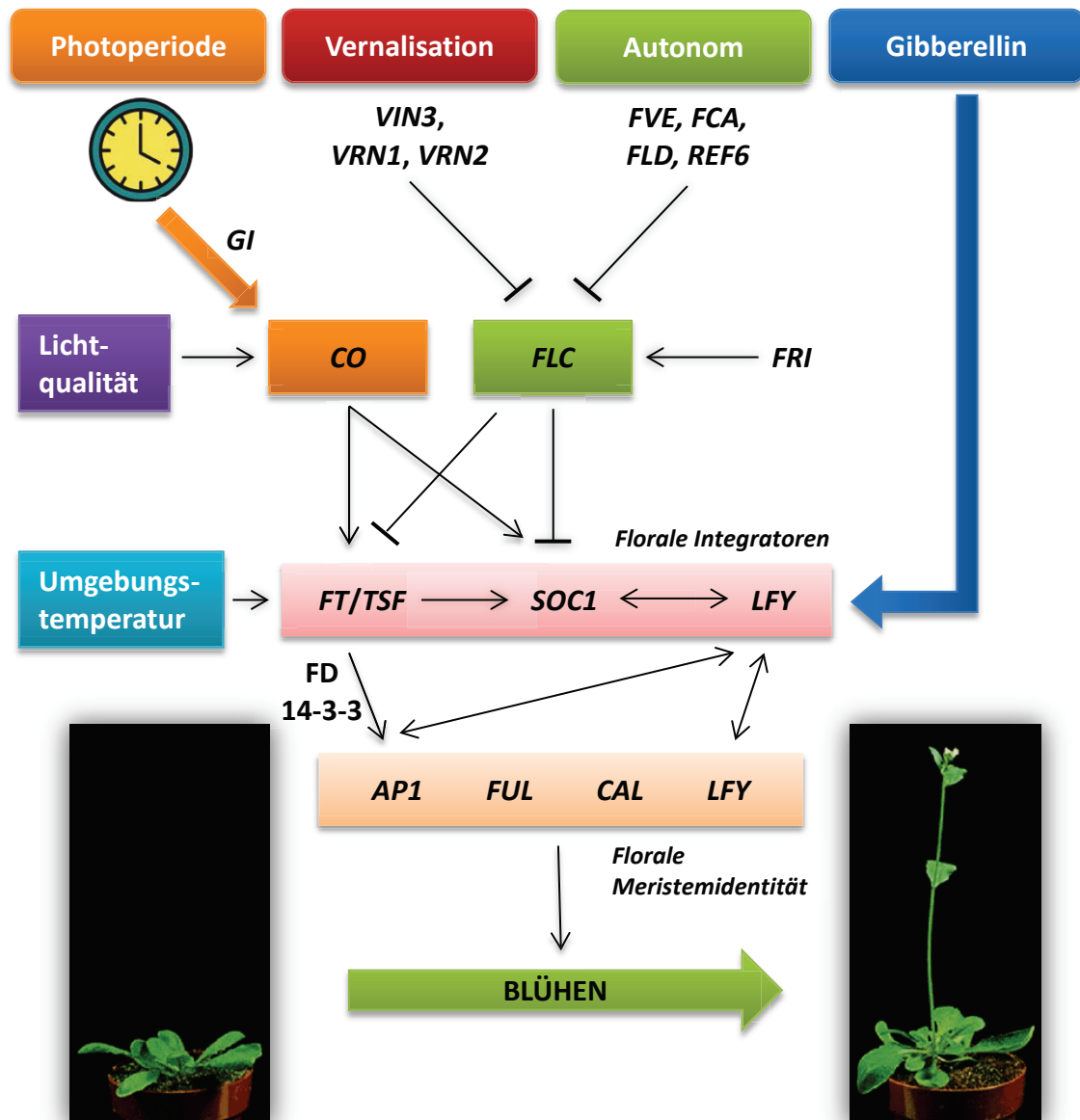


Abbildung 1.3: Signalwege der genetischen Regulation der Blühinduktion von *A. thaliana*.

Schematische Darstellung von wesentlichen genetischen Signalwegen der Blühinduktion in *A. thaliana* (Corbesier, L. and Coupland, G. 2006). Der Signalweg der Photoperiode fördert das Blühen als Reaktion auf Langtag. Die Expression von *GI* und *CO* wird durch die circadiane Uhr reguliert. Bestimmte Umweltfaktoren nehmen Einfluss auf den Blühzeitpunkt, z.B. die Umgebungstemperatur – durch die Regulation von *FT* und die Lichtqualität – zum großen Teil durch die Regulation von *CO*. Die Blühinduktion durch Vernalisation erfolgt durch die Reprimierung von *FLC*, nachdem Pflanzen einer längeren Kälteperiode ausgesetzt waren. Im autonomen Signalweg wird unabhängig von der Vernalisation, durch Histon-Modifikationen und RNA-Prozessierung *FLC* reprimiert. Der Signalweg über Gibberelline aktiviert den floralen Integrator und das Florigen *FT*, insbesondere unter Kurztag. Alle Signalwege konvergieren in der Aktivierung von floralen Integratoren, *FT*, *SOC* und *LFY*, deren Expression die Spezifikation der floralen Meristemidentität an lateralen Organprimordien bewirkt (Corbesier, L. and Coupland, G. 2006).

formationen des Tag-und-Nacht-Rhythmus über die molekulare Uhr und die Lichtsensoren implementiert. Die Verarbeitung dieser Signale über *GIGANTEA* (*GI*) moduliert die Expression von *CONSTANS* (*CO*) (Redei, G. P. 1962, Suarez-Lopez, P. et al. 2001). Die Expression von *CO* führt zur Aktivierung des Florigens *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), das in einem Proteinkomplex mit *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) und dem 14-3-3-Protein die Blühinduktion umsetzt (Abe, M. et al. 2005, Taoka, K. et al. 2011, Wigge, P. A. et al. 2005). In einem etwas geringeren Ausmaß wird die Blühinduktion auch durch weitere Umweltfaktoren – Lichtqualität und Umgebungstemperatur – bestimmt. Beispielsweise führt die Kultivierung von *A. thaliana* unter 16°C zu einem späteren Blühzeitpunkt als bei 22°C. Die Implementierung der Umgebungstemperatur erfolgt durch die Modulation der Expression von *FT* (Blazquez, M. A. et al. 2003). Die Reduktion des Lichtspektrums auf dunkles rotes Licht simuliert Schattenbedingungen, die bei dichtem Wachstum auftreten können, woraufhin *A. thaliana* mit der Beschleunigung des Blühens reagiert. Diese Unterschiede der Lichtqualität werden zum großen Teil durch die Regulation von *CO* in das Entwicklungsprogramm aufgenommen (Cerdan, P. D. and Chory, J. 2003). Die Blühinduktion durch Vernalisation wird durch die Exposition einer längeren Kälteperiode bewirkt und beschleunigt das Blühen nach dem Durchleben der Kälteperiode. Dies wird in *A. thaliana* erreicht, indem der florale Repressor *FLC* während der Vernalisationsphase epigenetisch, durch H3K27me3 reprimiert wird (Bastow, R. et al. 2004, Sheldon, C. C. et al. 2000, Sung, S. and Amasino, R. M. 2004). Die Aufrechterhaltung des reprimierten Zustands von *FLC* wird vom PRC2 sichergestellt, zu dessen Komponenten bei der durch Vernalisation vermittelten Reprimierung *VRN2* gehört. Das mit dem PRC2 assoziierte *VERNALISATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) spielt bei der Etablierung des reprimierten Zustands von *FLC* eine entscheidende Rolle (Kim, D. H. and Sung, S. 2013). Unabhängig vom Regulationsmechanismus durch die Vernalisation wird die Blühinduktion durch einen autonomen Mechanismus initiiert, bei dem ebenfalls *FLC* reprimiert wird (Boss, P. K. et al. 2004). In diesem Signalweg ist eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Kategorien beteiligt, die durch die Regulation des Chromatinzustands oder durch posttranskriptionale Regulation *FLC* reprimieren (Srikanth, A. and Schmid, M. 2011). Somit ist *FLC* als ein wichtiger Konvergenzpunkt verschiedener Regulationsmechanismen der Blühinduktion herauszustellen. Die Initiierung der Blühinduktion durch Gibberelinsäuren gehört zur hormonellen Regulation des Blühens und erfolgt, insbesondere unter Kurztag, durch die zu *CO* parallelen Aktivierung der Genexpression von *FT* (Hisamatsu, T. and King, R. W. 2008). Alle genetischen Signalwege der Blühinduktion konvergieren in der Aktivierung von floralen Integratoren – *FT*, *SOC* und *LFY*, die in lateralen Organanlagen durch die Aktivierung von *LFY*, *API*, *CAL* und *FUL* die florale Meristemidentität spezifizieren.

1.2.4. *FT* – das mobile Signal der Blühinduktion

Die Funktion von *FT* als mobiles Signal zur Blühinduktion, dessen Funktion in vielen Pflanzenspezies konserviert ist, wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht und charakterisiert. Im photoperiodischen Regulationsmechanismus propagiert es abhängig von der Tageslänge den Übergang von vegetativer zur reproduktiven Entwicklung, indem es nach seinem Transport zum Sprossapikalmeristem im Proteinkomplex mit dem im Meristem exprimierten Transkriptionsfaktor *FD* und 14-3-3 Protein den Regulator der floralen Meristemidentität *API* und möglicherweise andere blütenspezifische homeotische Gene aktiviert. Der Funktionsverlust von *FT* bewirkt ein verspätetes Blühen unter Langtag-Bedingungen, dessen Zeitpunkt dem Blühzeitpunkt unter Kurztag-Bedingungen entspricht, unter denen *FT* vollständig reprimiert ist.

In der vegetativen Entwicklung wird die Blühinduktion durch die Expression der Komponenten des floralen Repressorkomplexes aus *FLC* und *SVP* unterdrückt, der einen wichtigen Konvergenzpunkt verschiedener Regulationsmechanismen der Blühinduktion darstellt (Hartmann, U. et al. 2000, Li, D. et al. 2008). Durch die direkte Bindung des *FLC-SVP*-Repressorkomplexes an die Promotoren von *SOC1* und *FT* wird deren Expression unterdrückt. Trotz vieler paralleler und unabhängiger Wege der Vermittlung der Blühinduktion stellt *FT* eine Schlüsselkomponente dar, dessen Proteinfunktion in Blättern als mobiles Signal der Blühinduktion in vielen Pflanzenspezies konserviert ist.

FT codiert ein globuläres 20 kDa Protein, das in Geleitzellen des Phloems von Rosettenblättern exprimiert und zum SAM transportiert wird (Mathieu, J. et al. 2007). Im SAM bildet *FT* mit dem b-ZIP Transkriptionsfaktor FLOWERING LOCUS D (*FD*) und dem 14-3-3 Protein einen Proteinkomplex, der durch die indirekte Aktivierung von *LFY* über *SOC1* und *FUL* die Blühinduktion und durch die direkte Aktivierung von *API* die Initiierung von FM im IM bewirkt (Abe, M. et al. 2005, Taoka, K. et al. 2011, Wigge, P. A. et al. 2005). Weitere genetische Analysen, bei denen Mehrfachmutanten *ft stm*, *ft lfy*, *ft ap1*, *lfy ap1* phänotypisch analysiert wurden, implizieren, dass *FT* nicht nur als mobiles Signal zum Auslösen der Blühinduktion fungiert, sondern auch eine Rolle bei der Entwicklung lateraler Meristeme und der Spezifizierung der FM spielt (Ruiz-Garcia, L. et al. 1997, Smith, H. M. et al. 2011). *FT* und *LFY* aktivieren in einem parallelen Regulationsmechanismus *API*, das für die Determinierung von FMI notwendig ist. Da *ft lfy* Doppelmutanten einen stärkeren Infloreszenzphänotyp entwickeln als *ap1 lfy* Doppelmutanten und *ap1 cal lfy* Dreifachmutanten, liegt die Vermutung nahe, *FT* könnte weitere Gene regulieren, die für die Spezifizierung der FMI notwendig sind (Ruiz-Garcia, L. et al. 1997).

Das Genom von *Arabidopsis* beinhaltet sechs Proteine mit ähnlicher Sequenz wie *FT*. Alle sechs Proteine haben eine Ähnlichkeit zur Gruppe von *Raf kinase inhibitor* bzw. *phosphatidylethanol-amine-binding* Proteinen (RKIP/PEBP), deren biochemische Funktion in Pflanzen bislang unbekannt ist (Kobayashi, Y. et al. 1999). Außer *FT* spielen auch einige seiner Homologen eine wichtige Rolle bei der Blühinduktion. Eines davon, *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), unterdrückt vorzeitiges Blühen und übt damit eine zu *FT* antagonistische Rolle aus. Außerdem sorgt *TFL1* während der reproduktiven Phase der Entwicklung für das Aufrechterhalten der IM-Identität. Namensgebend für *TFL1* ist der Phänotyp von *tfl1* Mutanten, deren IM in einer finalen Blüte (*terminal flower*) terminieren (Ahn, J. H. et al. 2006).

Das mit *FT* am nächsten verwandte Homolog ist *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*). *TSF* hat eine zu *FT* redundante Funktion als floraler Integrator, kann jedoch den Funktionsverlust von *FT* nicht kompensieren. *tsf* Mutanten entwickeln keinen spätblühenden Phänotyp unter Langtag-Bedingungen, wie es die *ft* Mutanten tun. Allerdings blühen *ft tsf* Doppelmutanten später als *ft* Mutanten unter Langtag-Bedingungen und verstärken den spätblühenden Phänotyp unter Kurztag (Yamaguchi, A. et al. 2005). Genau wie *FT* ist *TSF* im Phloem exprimiert, das Expressionsprofil in Keimlingen unterscheidet sich jedoch grundlegend. Während *FT* in Keimblättern und Rosettenblättern auf der apikalen Blattseite exprimiert ist, ist *TSF* am stärksten im Hypocotyl, in Blütenstielen und auf der basalen Seite von Keimblättern exprimiert. Studien mit Promotorfusionen von *TSF* mit einem Reporterprotein zeigen auch punktuelle Expression am SAM, an Stellen, wo Blattprimordien anlegt werden (Yamaguchi, A. et al. 2005).

Obwohl *FT* und *TSF* durch *CO* im photoperiodischen Regulationsmechanismus aktiviert werden, haben sich deren Funktionen unterschiedlich evolviert. Diese Tatsache beschränkt sich jedoch nicht auf *Arabidopsis*. In Reispflanzen gibt es neun *FT*-Homologe, von denen drei zur *FT*-*TSF*-Klade gehören. Bei diesen Homologen sind ebenfalls Regulationsunterschiede zu beobachten wie bei *FT* und *TSF* in *A. thaliana*. Anhand der unterschiedlichen Expressionsprofile und der Unterschiede in der photoperiodischen Regulation wird davon ausgegangen, dass die *FT*-Homologen die Rolle der Feinjustierung des Blühzeitpunkts übernehmen (Izawa, T. et al. 2002).

1.2.5. Initiation und Spezifikation von floraler Meristemidentität

Die Blühinduktion wird durch ein Netzwerk von Regulationsketten verschiedener genetischer Mechanismen initiiert (s. Kapitel 1.2.3). Die Entwicklung von Blüten findet ausschließlich durch die FM statt, die durch das reproduktive SAM, das IM, produziert werden. Die Vermittlung der Blühinduktion durch alle Signalwege konvergieren in der Aktivierung der Genexpres-

sion von zwei wichtigen floralen Integratoren, *SOC1* und *FT*. Für die Transformation des vegetativen SAM in ein IM, das die Kompetenz zur Entwicklung von FM besitzt, ist die Aktivierung von *LEAFY* (*LFY*) und *APETALA1* (*API*) notwendig (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990, Mandel, M. A. and Yanofsky, M. F. 1995). *SOC1* aktiviert *LFY* durch direkte Bindung an den *LFY*-Promoter, *API* – durch die Bindung des FT-FD-Komplexes, wobei *LFY* und *API* in einem durch Rückkopplung geregelten Mechanismus die Expression gegenseitig positiv regulieren (Blazquez, M. A. et al. 2006).

Die Spezifizierung der FM durch *LFY* und *API* ist durch deren Homologe in verschiedenen Pflanzenspezies konserviert. *LFY* ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl die FM-Identität (FMI) als auch die floralen homeotischen Gene reguliert (Hempel, F. D. et al. 1997, Schultz, E. A. and Haughn, G. W. 1991, Weigel, D. et al. 1992). *lfy* Mutanten entwickeln anstelle von Blüten bildenden FM Blätter mit lateralen Meristemen, die sekundäre Infloreszenzen produzieren, so dass *lfy*-Infloreszenzen einen vegetativen Charakter aufweisen. *API* und *CAULIFLOWER* (*CAL*) sind homologe MADS-Box Transkriptionsfaktoren, die in redundanter Weise für die Determinierung der FMI zuständig sind (Kempin, S. A. et al. 1995, Mandel, M. A. et al. 1992, Mandel, M. A. and Yanofsky, M. F. 1995). *ap1 cal* Doppelmutanten entwickeln FM, die sehr früh zu IM zurück transformieren – eine Reversion des floralen Meristems zum Infloreszenzmeristem, die als florale Reversion bezeichnet werden kann (Bowman, J. L. et al. 1993). Als Folge entwickeln *ap1 cal* Doppelmutanten an Positionen, an denen normalerweise FM produziert werden, ständig neue IM, die zum charakteristischen *cauliflower* Phänotyp führen, der an Blumenkohl (auch eine Gattung der Kreuzblütler mit einer *cal* Mutation) erinnert (Kempin, S. A. et al. 1995). In der durch *API* und *CAL* vermittelten Regulation der FMI spielt ein drittes homologes MADS-Box Gen, *FRUITFULL* (*FUL*), eine redundante Rolle (Ferrandiz, C. et al. 2000). Obwohl in *ap1 cal* Doppelmutanten die FM durch IM ersetzt sind, so entwickeln sich im Laufe des Lebenszyklus FM, welche fertile Blüten bilden. In *ap1 cal ful* Trippelmutanten findet die Entwicklung von Blüten zu keinem Zeitpunkt statt.

1.2.6. Florale Reversion bei Arabidopsis Mutanten und in mehrjährigen Pflanzen

In der Pflanzenwelt kann zwischen monokarpen und polykarpen (früher auch etwas unpräzise als einjährig und mehrjährig bezeichneten) Pflanzenspezies unterschieden werden (Amasino, R. 2009). Monokarpe Spezies, zu denen auch Arabidopsis zählt, blühen nur ein Mal in ihrem Lebenszyklus. Nachdem das vegetative SAM von Arabidopsis zum IM und zur Produktion von Blüten transformiert, werden bis zum Generationsende nur Blüten entwickelt (Hempel, F. D. et

al. 2000, Tooke, F. et al. 2005). Nach der Produktion einer bestimmten Anzahl von Blüten, die zu fertilen Schoten werden, hören alle IM von *Arabidopsis* auf zu wachsen, arretieren im indeterminierten Zustand und es setzt die Seneszenz ein (Bleecker, A. B. and Patterson, S. E. 1997). Polykarpe Pflanzen behalten auch nach der Blühinduktion ein Reservoir von Meristemen, die die Kompetenz zum vegetativen Wachstum haben, um weitere Wachstumszyklen zu ermöglichen. Nach erfolgter Entwicklung von Infloreszenzen kehren Pflanzen also zur Produktion von vegetativen Sprossen zurück. Die florale Reversion bei polykarpen Pflanzenspezies dient daher als natürliche Anpassung an die Jahreszeiten, für ein mehrjähriges Wachstum (Amasino, R. 2009).

Bei *Arabidopsis* kommt florale Reversion, wie sie in polykarpen Spezies zu beobachten ist, nicht vor. Wegen unterschiedlicher Umweltbedingungen an verschiedenen Standorten musste sich *A. thaliana* an die jeweiligen Gegebenheiten der Standorte anpassen. Die Anpassungen an unterschiedliche Standorte wurden im Genom von *A. thaliana* evolutionär konserviert. Die verschiedenen Ökotypen entwickelten auch unterschiedliche Strategien der Blühinduktion. Da sowohl der Blühzeitpunkt, als auch die Morphologie des Sprosses für die Maximierung des Reproduktionserfolgs verantwortlich sind, ist auch deren Entwicklung miteinander verknüpft. Obwohl florale Reversion im Wildtyp von *A. thaliana* nicht vorkommt, so gilt dies nur beschränkt, für frühblühende Ökotypen, z.B. Col, Ws, Ler, die wegen ihrer kurzen Lebenszyklen von nur einigen Wochen unter induktiven Langtag-Bedingungen in der genetischen Forschung etabliert sind und auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Die in einigen *Arabidopsis* Mutanten (z.B. in *apl cal* Doppelmutanten und *apl cal ful* Trippelmutanten) beschriebene florale Reversion, die sich in der Transformation von FM zu IM äußert, ist eine Art der floralen Reversion, wie sie in monokarpen Spezies vorkommen kann. Aber nicht nur Mutanten können florale Reversion entwickeln. Der Wildtyp von *A. thaliana* des spätblühenden Ökotyps Sy-0 entwickelt florale Reversion, indem nach erfolgter Blütenentwicklung Brakteen produziert werden (Wang, Q. et al. 2007). Die florale Reversion kommt auch in anderen spätblühenden Ökotypen vor und ist auf die lange vegetative Phase zurückzuführen, welche durch die dominanten Allele von floralen Repressoren wie *FRIGIDA* und *FLC* beeinflusst wird (Grbic, B. and Bleecker, A. B. 1996, Poduska, B. et al. 2003).

Eine lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass selbst Mutanten von monokarpen Spezies, wie *Arabidopsis*, keine florale Reversion der polykarpen Art entwickeln können, da sehr viele redundante genetische Mechanismen den Übergang zur Blütenentwicklung aufrechterhalten, die sicherstellen, dass die Pflanzen nur ein Mal, aber mit der maximal möglichen Nachkommenzahl blühen. Weitere Mutanten-Analysen haben *FUL* zusammen mit *SOCI* in den Regulationsme-

chanismus der Spezifizierung der floralen Meristemidentität eingeordnet (de Folter S. et al. 2005, Melzer, S. et al. 2008). Die *soc1 ful* Doppelmutanten entwickeln eine polykarpe Art der floralen Reversion, indem IM zu vegetativen Meristemen revertieren (Melzer, S. et al. 2008). Nach erfolgter Blütenentwicklung produzieren laterale Meristeme Blätter anstelle von sekundären Infloreszenzen, was zur Bildung von oberirdischen Rosetten führt. *SOC1* und *FUL* könnten demnach zu einem genetischen Blockierungsmechanismus gehören, den monokarpe Pflanzenspezies entwickelt haben, um eine Rückkehr zum vegetativen Wachstum zu unterbinden (Amasino, R. 2009, Melzer, S. et al. 2008).

Genetische Analysen zur Kontrolle der Blühinduktion in *Lycopersicon esculentum* (Tomate) haben eine erweiterte Funktion vom FT-Ortholog SFT gezeigt. Zusätzlich zu dem auch in *A. thaliana* beschriebenen spätblühenden Phänotyp unter Langtag-Bedingungen, werden in *sft* Mutanten von *L. esculentum* Blüten durch vegetative Sprosse ersetzt (Molinero-Rosales, N. et al. 2004). Dieser Phänotyp zeigt, dass SFT während der Entwicklung der Infloreszenz in Tomate die florale Meristemidentität reguliert und impliziert, wegen der hohen Konservierung der FT-Funktion in verschiedenen Pflanzenspezies, dass *FT* auch in *A. thaliana* die florale Meristemidentität regulieren könnte.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

IBM1 ist eine H3K9me2-spezifische Histon-Demethylase in *A. thaliana*, die ektopische H3K9me2 und DNA-Methylierung des CHG-Typs an hunderten von Genen unterdrückt, die von der Histon-Methyltransferase *KYP* und DNA-Methyltransferase *CMT3* etabliert werden. Die Identifikation von neuen *ibm1* Allelen und einem neuem Phänotyp in meiner Diplomarbeit (Gregor Klein 2008, Diplomarbeit) legten nahe, dass *IBM1* die Aufrechterhaltung der Zellidentität in floralen Meristemen reguliert. Zudem deutet der Phänotyp auf die Notwendigkeit der Regulation der Genexpression durch H3K9me2 hin, obschon diese Chromatin-Modifikation zum großen Teil im Heterochromatin lokalisiert ist und für dessen transkriptionelle Inaktivierung sorgt. Um die Rolle von H3K9me2 bei der Regulation der Genexpression und Differenzierung von Zellen zu erforschen, soll in dieser Arbeit die Funktion der Histon-Demethylase IBM1 bei der Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität in *A. thaliana* untersucht werden.

Der Infloreszenzphänotyp von *ibm1* Mutanten soll charakterisiert und mit Mutanten, die vergleichbare Phänotypaspekte entwickeln, verglichen werden. Zudem sollen die von IBM1 regulierten Gene identifiziert und von jenen die Expression in *ibm1* Mutanten untersucht werden, deren Mutanten mit *ibm1* vergleichbare Entwicklungsdefekte aufweisen und die bei der Entwicklung der floralen Meristemidentität eine Rolle spielen. Desweiteren soll untersucht werden, ob IBM1 die florale Meristemidentität durch Demethylierung von H3K9me2 an Zielgenen reguliert. Dazu soll überprüft werden, ob die Zielgene in *ibm1* Mutanten ektopische H3K9me2 und DNA-Methylierung des CHG-Typs tragen. Überdies soll untersucht werden, ob der neue *ibm1* Phänotyp und die Repression von Zielgenen in *ibm1* Mutanten direkt von der ektopischen H3K9me2 und CHG-Methylierung abhängen. Dazu soll die *cmt3* oder *kyp* Mutation in *ibm1* Mutanten eingeführt werden, die den *ibm1* Phänotyp sowie die ektopische H3K9me2 und CHG-Methylierung unterdrücken, und in Doppelmutanten eine mögliche Wiederherstellung der Expression von Zielgenen untersucht werden.

2.Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen verwendet:

- *J.T.Baker*
- *Biomol* (Hamburg)
- *Merck-Eurolab* (Darmstadt)
- *Promega* (Heidelberg)
- *Roth* (Karlsruhe)
- *Serva* (Heidelberg)
- *Sigma* (Deisenhofen)
- *Clontech* (Heidelberg)
- *VWR* (Darmstadt)

2.1.2. Enzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden Enzyme der Firmen *Fermentas*, *NEB* und *Invitrogen*, nach den jeweiligen Herstellervorgaben und mit den beigefügten Puffern verwendet.

2.1.3. Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Eurogentec* bezogen, auf 100 μ M eingestellt und bei -70°C eingefroren. Die Arbeitslösungen wurden aliquotiert, auf 10 μ M verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.4. Bakterienstämme

Für Klonierungen und Amplifizierung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α verwendet. Der *E. coli* Stamm DB3.1 wurde zur Beherbergung und Amplifizierung von Plasmiden mit Gateway®-Kassetten (*Invitrogen*) verwendet, weil seine spezifische Mutation in der *Gyrase* vor dem toxisch wirkenden Gen *ccdB* schützt, welches auf der Kassette codiert ist. Der

Agrobacterium tumefaciens Stamm GV3101 wurde für Transformationen von *A. thaliana* mit pflanzlichen Expressionsvektoren verwendet.

E. coli

DH5 α : F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG*
 $\Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169, } hsdR17(r_K^- m_K^+), \lambda^-$

DB3.1: F- *gyrA462 endA1 glnV44* $\Delta(\text{sr1-recA})$ *mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-)* *a-ra14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5* $\Delta\text{leu mtl1}$

A. tumefaciens

GV3101: C58C1, *rif*, *pMP90* (*pTiC58* Δ T-DNA), *Gm^r* (Koncz und Schell, 1986)

2.1.5. Vektoren

pCR8[®]/GW/TOPO[®]

Der pCR8[®]/GW/TOPO[®] Vektor wurde für die Erzeugung des pCR8[®]/GW/TOPO[®]-IBM1 Entry-Vektors verwendet, welcher mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit den pflanzlichen Expressionsvektoren pMDC107 und pMDC163 für die Herstellung der Konstrukte *IBM1-GFP* und *IBM1-GUS* benutzt wurde. Der pCR8[®]/GW/TOPO[®] Vektor liefert eine bakterielle Spectinomycin-Resistenz.

pDONR[™]201

Der pDONR[™]201 Vektor wurde für die Erzeugung des Entry-Vektors pENTRY201-IBM1cDNA verwendet, welcher mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit den pflanzlichen Expressionsvektoren pMDC32 und pMDC83 für die Herstellung der Konstrukte *35S::IBM1* und *35S::IBM1-GFP* benutzt wurde. Der pDONR[™]201 Vektor liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz.

pMDC107

Der Expressionsvektor pMDC107 (Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003) wurde für die Generierung des *IBM1* expremierenden DNA-Konstrukts verwendet, mit dem die Komplementation der *ibm1* Mutante unternommen wurde. Der Vektor enthält eine Gateway[®]-Kassette (*Invitrogen*) vor der codierenden Sequenz von *GFP* und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine Hygromycin-Resistenz in den transgenen Pflanzen. Der

pMDC107 wurde verwendet, um mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit dem Entry-Vektor pCR8[®]/GW/TOPO[®]-IBM1 das Konstrukt *IBM1-GFP* zu erzeugen.

pMDC163

Der pflanzliche Expressionsvektor pMDC163 (Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003) wurde für die Herstellung des *IBM1-GUS* Reporterkonstrukts verwendet. Der Vektor enthält eine Gateway[®]-Kassette (*Invitrogen*) vor der codierenden Sequenz von β -*Glucuronidase* (*GUS*), ein Enzym, welches das in Pflanzen infiltrierte Substrat X-Gluc zu blaem Farbstoff umsetzt. pMDC163 liefert bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine Hygromycin-Resistenz in den transgenen Pflanzen. Der pMDC163 wurde verwendet, um mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit dem Entry-Vektor pCR8[®]/GW/TOPO[®]-IBM1 das Reporterkonstrukt *IBM1-GUS* zu erzeugen, mit dem das Expressionsprofil von *IBM1* untersucht wurde.

pMDC32

Der pflanzliche Expressionsvektor pMDC32 (Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003) wurde für die Herstellung der *35S::IBM* und *35S::IBM p.m.* Konstrukte verwendet. Der Vektor enthält eine Gateway[®]-Kassette (*Invitrogen*) nach dem doppelten *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) *35S*-Promotor, der eine konstitutive Überexpression des regulierten Gens bewirkt. pMDC32 liefert bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine Hygromycin-Resistenz in den transgenen Pflanzen. Der Vektor wurde verwendet, um mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit dem Entry-Vektor pENTRY201-IBM1cDNA die Konstrukte zu erzeugen, mit welchen die Funktionalität der JmjC-Domäne von IBM1 untersucht werden sollte.

pMDC83

Der pflanzliche Expressionsvektor pMDC83 (Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003) wurde für die Herstellung der *35S::IBM-GFP* Konstrukte verwendet. Der Vektor enthält eine Gateway[®]-Kassette (*Invitrogen*) nach dem doppelten *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) *35S*-Promotor, der eine konstitutive Überexpression des regulierten Gens bewirkt, und vor der codierenden Sequenz von *GFP*. pMDC83 liefert bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine Hygromycin-Resistenz in den transgenen Pflanzen. Der Vektor wurde verwendet, um mittels homologer Rekombination (Gateway[®]-System; *Invitrogen*) mit

2. Material und Methoden

dem Entry-Vektor pENTRY201-IBM1cDNA die Konstrukte zu erzeugen, mit welchen die zelluläre Lokalisation vom IBM1-Protein untersucht werden sollte.

2.1.6. Antibiotika

Zur Herstellung von antibiotikahaltigen Medien wurden folgende Antibiotika auf die jeweiligen Ausgangskonzentrationen eingestellt und bei -20°C aufbewahrt.

Antibiotika	Ausgangskonzentration	Endkonzentration in Pflanzenmedien	Endkonzentration in Bakterienmedien
Ampicilin	100 mg/ml		100 µg/ml
Gentamycin	25 mg/ml		25 µg/ml
Hygromycin	15 mg/ml	15 µg/ml	
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Rifampicin	25 mg/ml		50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml		50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml		1 µg/ml

2.1.7. Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Mutanten und transgenen Linien von *A. thaliana* gearbeitet:

Genotyp	Ökotyp	Transgen	Kategorie	Bezugsquelle
<i>ibm-12</i>	Ws	FLAG_614B07	T-DNA-Insertionsmutante	Institut national de la recherche agronomique (INRA) Versailles
<i>ibm-11</i>	Ws	FLAG_442F08	T-DNA-Insertionsmutante	Institut national de la recherche agronomique (INRA) Versailles
<i>ibm-5</i>	Col	SALK_006542	T-DNA-Insertionsmutante	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
<i>cal-6</i>	Col	GABI_274F12	T-DNA-Insertionsmutante	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
<i>ft-13</i>	Ws	FLAG_107E06	T-DNA-Insertionsmutante	Institut national de la recherche agronomique (INRA) Versailles
<i>cmt3</i>	Ws	FLAG_562B05	T-DNA-Insertionsmutante	Institut national de la recherche agronomique (INRA) Versailles
WT	Col	FT::GUS	<i>FT</i> -Reporterlinie	(Takada, S. and Goto, K. 2003)
WT	Ws	FT::GUS	<i>FT</i> -Reporterlinie	AG Franziska Turck (Adrian, J. et al. 2010)

2.1.8. Antikörper

Für die Chromatin-Immunoprecipitation wurde der monoklonale Antikörper gegen dimethyl-H3K9 mAbcam1220 der Firma *Abcam* verwendet, mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml.

2.1.9. Medien

- ½ MS-Festmedium:
 - 0,22% (w/v) MS-Salze
 - 0,05% (w/v) MES
 - 0,5% (w/v) Saccharose
 - 0,8% (w/v) Agar
- LB-Medium:
 - 1% (w/v) NaCl
 - 1% (w/v) Hefeextrakt
 - 2% (w/v) Bacto-Trypton
 - 3% (w/v) Bacto-Agar (für Festmedien)
- SOB-Medium:
 - 10 mM NaCl
 - 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 - 2% (w/v) Bacto-Trypton
 - 2,5 mM KCl
 - 10 mM MgSO₄
 - 10 mM MgCl₂
- YEB-Medium:
 - 1% (w/v) Rinderextrakt
 - 0,2% (w/v) Hefeextrakt
 - 0,2% (w/v) Bacto-Peptone
 - 1% (w/v) Saccharose
- Infiltrationsmedium für Pflanzentransformation:
 - 5% (w/v) Saccharose
 - 0,05% Silwet
 - einige Kristalle MgSO₄

2.1.10. Lösungen und Puffer

- Lösung zur Samensterilisation:
 - 70% EtOH
 - 0,1 % Triton X-100
- DNA-Extraktionspuffer:
 - 200 mM Tris-HCl pH 7,5
 - 250 mM NaCl
 - 25 mM EDTA

- DNA-Extraktionspuffer II
 - 100 mM Tris-HCl, pH 8
 - 50 mM EDTA, pH 8
 - 500 mM NaCl
 - 1,65 % (w/v) SDS
 - 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol
- TB-Puffer:
 - 10 mM PIPES pH 6,4
 - 55 mM MnCl_2
 - 5 mM CaCl_2
 - 250 mM KCl
- TE-Puffer:
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 2 mM EDTA
- Plasmid Mini-Präp.-Lösung II:
 - 0,2 M NaOH
 - 1% SDS
- Plasmid Mini-Präp.-Lösung III:
 - 3 M Kaliumacetat
 - 11,5% (v/v) Essigsäure
- PCI-Lösung:
 - 50% (v/v) Phenol
 - 48% (v/v) Chloroform
 - 2% (v/v) Isoamylalkohol
- 10x PCR-Puffer:
 - 500 mM Tris-HCl pH 8,3
 - 5 mg/ml BSA
 - 5 % Ficoll
 - 10 % Saccharose
 - 300 mM KCl
 - 30 mM MgCl_2
 - 10 mM Tartrazine

Puffer für ChIP

- Extraktionspuffer 1:
 - 0,4 M Saccharose
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 10 mM MgCl_2
 - 5 mM β -Mercaptoethanol
 - 0,2 mM PEFABLOC
 - 0,5% (v/v) plant PI
 - 1 mM EDTA

- Extraktionspuffer 2:
 - 0,25 M Saccharose
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 10 mM MgCl₂
 - 5 mM β-Mercaptoethanol
 - 0,2 mM PEFABLOC
 - 0,5% (v/v) plant PI
 - 1 mM EDTA
 - 1% Triton X-100

- Extraktionspuffer 3:
 - 1,7 M Saccharose
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 2 mM MgCl₂
 - 5 mM β-Mercaptoethanol
 - 0,2 mM PEFABLOC
 - 0,5% (v/v) plant PI
 - 1 mM EDTA
 - 0,15% Triton X-100

- Nuclei Lysis Puffer:
 - 50 mM Tris-HCl pH 8
 - 10 mM EDTA
 - 1% SDS
 - 0,2 mM PEFABLOC
 - 0,5% (v/v) plant PI

- ChIP Dilution Puffer:
 - 16,7 mM Tris-HCl pH 8
 - 1,2 mM EDTA
 - 167 mM NaCl
 - 0,2 mM PEFABLOC
 - 1,1% Triton X-100

- Elution Puffer:
 - 1% SDS
 - 0,1 M NaHCO₃

- Low Salt Wash Puffer:
 - 20 mM Tris-HCl pH 8
 - 2 mM EDTA
 - 150 mM NaCl
 - 0,1% SDS
 - 1% Triton X-100

- High Salt Wash Puffer:
 - 20 mM Tris-HCl pH 8
 - 2 mM EDTA
 - 500 mM NaCl
 - 0,1% SDS
 - 1% Triton X-100

- LiCl Wash Puffer:
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 1 mM EDTA
 - 0,25 M LiCl
 - 1% Natriumdeoxycholat
 - 1% NP40

Lösungen für die GUS-Färbung

- Inkubationslösung:
 - 0,05 M NaHPO₄ pH 7,2
 - 0,5 mM K₃Fe(CN)₆
 - 0,5 mM K₄Fe(CN)₆
 - 1 mM EDTA
 - 1% Triton X-100
 - steriles dH₂O
- Färbelösung:
 - 0,05 M NaHPO₄ pH 7,2
 - 0,5 mM K₃Fe(CN)₆
 - 0,5 mM K₄Fe(CN)₆
 - 1% Triton X-100
 - 2 mM X-Gluc
 - steriles H₂O

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Arbeiten mit Nukleinsäure

*2.2.1.1.1. Schnelle Extraktion genomischer DNA aus *A. thaliana**

Zur Genotypisierung der Pflanzen wurde eine modifizierte DNA-Präparationsmethode von Dellaporta et al. (1983) (Weigel, D. and Glazebrook, J. 2009) angewandt. Ein Stück eines Rosettenblatts wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im flüssigen Stickstoff schockgefroren, grob zerrieben, in 400 µl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und geschüttelt. Zur Pelletierung des Gewebes wurde zwei Minuten mit 16.000 g zentrifugiert, 300 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Nukleinsäuren mit 300 µl Isopropanol versetzt und geschüttelt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch 10-minütige Zentrifugation mit 16.000 g pelletiert, luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Danach wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

*2.2.1.1.2. Effiziente Extraktion genomischer DNA aus *A. thaliana**

Für die Extraktion größerer Mengen genomischer DNA aus *A. thaliana* wurde eine effizientere Methode angewandt, ebenfalls nach modifiziertem Protokoll von Dellaporta et al. (1983). 200-500 mg Blattmaterial wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in einem Reaktionsgefäß homogenisiert. Nach Zugabe von 650 µl des auf 65 °C erwärmten DNA-Extraktionspuffers II wurde die Lösung gemischt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 230 µl 5 M Kaliumacetat wurde erneut gemischt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach 10 Minuten lang mit 14.000 g zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit dem gleichen Volumen PCI-Lösung versetzt, geschüttelt und 5 Minuten mit 12.000 g zentrifugiert. Die entstandene wässrige Oberphase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde mit 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch zweiminütige Zentrifugation mit 14.000 g, der Überstand wurde verworfen und das luftgetrocknete Pellet in 80 µl dH₂O/RNaseI aufgenommen.

2.2.1.1.3. Extraktion von RNA aus *A. thaliana*

Die Extraktion von RNA aus *A. thaliana* erfolgte mit dem RNeasy®-Kit von Qiagen. Die Anleitung für die Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe wurde befolgt.

2.2.1.1.4. Quantifizierung von DNA / RNA

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit *Invitrogens* Qubit® Fluorometer und den dazugehörigen Puffern und Reagenzien durchgeführt. Die Anweisungen für die Benutzung des Geräts wurden befolgt.

2.2.1.1.5. Sequenzierung von DNA

Alle DNA-Sequenzierungen erfolgten im Auftrag durch *Sequence Laboratories GmbH* in Göttingen. Die Reaktionsansätze aus DNA und Primer wurden nach Firmenvorgaben zusammengesetzt.

2.2.1.1.6. Genotypisierung von *A. thaliana*-Mutanten

In dieser Arbeit wurde mit T-DNA-Insertionsmutanten gearbeitet, deren Insertionsstelle im Genom bekannt war. Es wurden deren segregierende Populationen angezogen und Individuen des Wildtyps oder solche mit hemizygoter oder homozygot vorliegenden T-DNA Insertion identifiziert. Dazu wurden um die propagierte T-DNA-Insertionsstelle zwei flankierende und T-DNA-spezifische Primer konstruiert (Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Skizze des Systems, nach dem transgene Individuen genotypisiert wurden.

Durch den grauen Kasten ist eine T-DNA dargestellt, die an einer bestimmten Stelle des Genoms inseriert ist. (LB = left boarder, RB = right boarder, Pfeile = Oligonukleotide, Linie = genomische DNA-Sequenz.)

Die Genotypisierung eines Individuums erforderte zwei PCR-Reaktionsansätze: ein PCR-Ansatz enthielt das T-DNA flankierende Primerpaar (g1/g2) und lieferte bei wildtypischer DNA-Sequenz ein 800-900 bp Produkt, ein zweiter PCR-Ansatz enthielt einen T-DNA Primer (lb oder rb) und den entsprechenden genomischen Primer, der bei Vorhandensein der T-DNA

2. Material und Methoden

ein 500-700bp Produkt lieferte. Je nach dem, welches PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, ergab sich der Genotyp (Abbildung 2.2).

Ein 20 µl PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung setzte sich folgendermaßen zusammen:

2 µl 10x PCR-Puffer
2x 0,5 µl 10 µM Primer
0,5 µl 10 mM dNTPs
2 µl genomische DNA
0,2 µl Taq-Polymerase
14,3 µl dH₂O

Der PCR-Puffer enthielt alle benötigten Komponenten zum sofortigen Auftragen des PCR-Produkts auf ein Agarose-Gel.

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

1. Schritt:	95°C	3:00 min	
2. Schritt	95°C	0:30 min	} 35 Zyklen
3. Schritt	58°C	0:30 min	
4. Schritt	72°C	1:20 min	
5. Schritt	72°C	5:00 min	
6. Schritt	8°C	Pause	

Es wurden 10 µl des PCR-Produkts auf einem 1% Agarose-Gel analysiert.

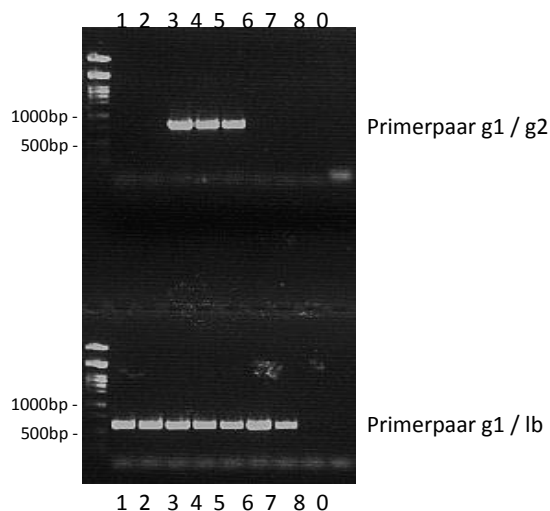


Abbildung 2.2: Beispiel einer Genotypisierung.

Eine segregierende Population der T-DNA Linie FLAG_442F08 wurde in axenischer Kultur mit Kanamycin auf die T-DNA-enhaltenen Individuen selektiert. Demnach sind Individuen 3, 4 und 5 hemizygot, die Individuen 1, 2, 6, 7 – homozygot; bei Individuum 8 fehlte die DNA, die Spur 0 ist Wasserkontrolle.

2.2.1.1.7. cDNA-Synthese auf der Grundlage von mRNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit reverser Transkriptase SuperScript™ II von *Invitrogen*. Als Primer wurde Oligo(dT)¹⁸ von *Fermentas* verwendet. Angaben von *Invitrogen* zur Synthese von cDNA wurden befolgt.

2.2.1.1.8. Gen-Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR

Die Gen-Expressionsanalysen wurden mit quantitativer real-time RT-PCR durchgeführt. Ein 25 µl PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

12,5 µl MESA 10x Mastermix
0,25 µl 10 µM Primer for
0,25 µl 10 µM Primer rev
10 µl dH₂O
2 µl cDNA

Für die PCR wurde der Chromo4™ Real-Time PCR Detector sowie die PC-Software Opticon Monitor™ von *Bio-Rad* verwendet.

2.2.1.2. Arbeiten mit *Escherichia Coli*

*2.2.1.2.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli**

E.coli Zellen wurden im SOB-Medium bei 20°C über Nacht bis OD₆₀₀ 0,6 angezogen. Die Kultur wurde in einem sterilen Zentrifugenbecher 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurde die Kultur 10 Minuten bei 4°C und 2.500 g zentrifugiert und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation, nach der das Zellenpellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert wurde. Zu der Zellsuspension wurde langsam 1,4 ml DMSO zugegeben, gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl hergestellt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

2.2.1.2.2. Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

200 µl tiefgefrorener Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Damit die Zellen DNA aufnehmen, wurde die Bakterienlösung für 40 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Danach wurde sofort 800 µl SOB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 Stunde unter 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 5.000 g abzentrifugiert, 500 µl des Mediums abgenommen, die Zellen mit dem übrigen Medium homogenisiert und auf antibiotikahaltigem LB-Medium ausgestrichen. Die Kulturen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.2.3. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Anzucht der Flüssigkulturen wurden einzelne Klone mit sterilen 200 µl Pipettenspitzen gepickt und in 4 ml flüssigem antibiotikahaltigem LB-Medium bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der dichten Kulturen in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgenommen und die restliche Kultur bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden zur Pelletierung mit 16.000 g 1 Minute zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Danach wurde der Reihe nach 200 µl Mini-II-Lösung und 150 µl Mini-III-Lösung zugegeben und invertiert. Daraufgehend wurde 10 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde mit 96% (v/v) Ethanol aufgefüllt und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 21.000 g 20 Minuten zentrifugiert. Zum Abschluss wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl 10 mM Tris pH8 mit RNase aufgenommen. Für Testrestriktion wurden 100-200 ng DNA verwendet, nachdem die präparierte Plasmid-DNA durch Auftragen von 1 µl auf 1% Agarose-Gel grob quantifiziert wurde. Für weitere Reaktionen und Sequenzierungen wurde saubere Präparation von Plasmiden in größeren Mengen angewandt. Hierzu wurde das *Plasmid Purification System* von Promega verwendet.

2.2.1.2.4. Herstellung von Glycerol-Stocks

Um jederzeit auf einen bestimmten Klon zurückgreifen zu können, wurden die Zwischenschritte von Klonierungen und Endklone in Form von Glycerol-Stocks bei -70°C gesichert. 800 µl einer Flüssigkultur mit OD₆₀₀ = 0,8 wurden mit 600 µl 86% (v/v) Glycerol gemischt, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.1.3. Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1.3.1. Herstellung kompetenter Zellen von *A. tumefaciens*

Eine Glycerin-Kultur des Stamms GV3101 von *A. tumefaciens* wurde auf YEB ausgestrichen. Einzelkolonien wurden gepickt und 2 Tage bei 28°C in 10 ml YEB Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Die Vorkultur wurde in 500 ml übergeimpft und bis $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Dann wurden die Zellen geerntet: Zur Pelletierung wurde 5 Minuten bei 5.000rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 ml 0,15 M NaCl resuspendiert. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 5.000 rpm wurde das Zellenpellet in 10 ml eiskaltem 20 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Die Lösung wurde zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.3.2. Transformation kompetenter *A. tumefaciens* mit DNA-Konstrukten

Um die hergestellten *IBM1*-Expressionskonstrukte in Pflanzen zu transformieren, wurden die Vektoren aus *E. coli* extrahiert (s. 2.4.3), mit NdeI-Restriktion getestet und in Agrobakterien transformiert. Dazu wurden 10µl der *E.coli* DNA-Minipräparation mit den 200 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gemischt. Damit die Zellen DNA aufnehmen wurden die Zellen der Reihe nach 5 Minuten auf Eis, danach 5 Minuten im flüssigen Stickstoff und weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 800 µl YEB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 3-4 Stunden bei 28°C und 230 rpm geschüttelt. Darauf folgend wurden die Zellen bei 5.000 g pelletiert, 500 µl des Überstands abgenommen, das Zellenpellet in restliches Medium aufgenommen und auf YEB-Medium mit Antibiotika Rifampicin, Gentamycin und dem jeweiligen Antibiotikum für den transformierten Vektor ausgestrichen. Die Kulturen wurden bei 28°C 2-3 Tage inkubiert.

2.2.2. Methoden der Epigenetik

2.2.2.1. Methylierungsabhängige DNA-Restriktion

McrBC ist eine Endonuklease, die die DNA bei Vorhandensein der Cytosin-Methylierung (5-Methylcytosin oder 5-Hydroxymethylcytosin oder N4-Methylcytosin) schneidet (Gowher, H. et al. 2000, Hublarova, P. et al. 2009, Sutherland, E. et al. 1992). In Abwesenheit der DNA-Methylierung findet keine Restriktion statt. Die DNA-Erkennungssequenz von McrBC bildet ein mit vorangegangener Purinbase methyliertes Cytosinpaar, das 40 bp bis 3 kb voneinander

entfernt sein kann (5'...Pu^mC(N₄₀₋₃₀₀₀)Pu^mC...3'). Die optimale Entfernung zweier methylierter Cytosine für eine effiziente Restriktion mit McrBC beträgt 55-103 bp. Die Reaktion benötigt GTP.

Da die Hälften der Erkennungssequenz von McrBC sehr kurz sind (Pu^mC) und mindestens zwei methylierte Cytosine auf einem der DNA-Stränge benötigt werden, können mit dieser Methode auch relativ schwache Methylierungszustände von genomischen Regionen nachgewiesen werden.

2.2.2.1.1. Restriktion genomischer DNA mit McrBC

Die genomische DNA wurde extrahiert aus Hochblättern des Wildtyps Wassilewskija und der Mutante *ibm1-12* nach der im Kap. 2.2.1.1.2 beschriebenen Methode. Je Genotyp wurden 500 ng genomischer DNA mit der methylierungsabhängigen Endonuklease McrBC von *NEB* behandelt, der Rest wurde aufgehoben für die Ladekontrolle. Die Restriktion der DNA mit McrBC wurde nach der Protokolanweisung von *NEB* durchgeführt.

2.2.2.1.2. Amplifikation genomischer Regionen

Die methylierungsabhängige Restriktion genomischer DNA mit McrBC wurde durch die PCR von den zu untersuchenden genomischen Regionen nachgewiesen. Bei vorhandener DNA-Methylierung und einer erfolgten Restriktion eines DNA-Abschnitts durch McrBC sollte eine geringere Menge des PCR-Produkts von dieser Region amplifiziert werden können. Unmethylierte DNA-Regionen, welche nicht restringiert wurden, sollten mit der PCR amplifiziert werden können.

Der Untersuchung von DNA-Methylierung am *FT*-Locus gingen interne Kontrollen voran. Es wurden zwei Kontolloci ausgewählt, die als Kontrolle der methylierungsabhängigen Restriktion fungierten. Der in allen somatischen Zellen hoch methylierte und transkriptionell inaktive Locus *TA3* diente als Positivkontrolle der Restriktion. Die PCR von *TA3* sollte eine geringere Menge des Produkts liefern im Vergleich zur PCR der nicht behandelten genomischen DNA. Ein weiterer Locus wurde benötigt, um die Resistenz nichtmethylierter DNA gegen McrBC nachweisen zu können. *ACTIN4* (*ACT4*) ist in *A. thaliana* ubiquitär exprimiert und der Erwartung nach nicht methyliert. Die Amplifikation der *ACT4*-Region auf der Grundlage von der McrBC-behandelten DNA sollte die gleiche PCR-Produktmenge liefern wie dieselbe PCR auf der Grundlage von der nichtbehandelten DNA.

Ein 20 µl PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der McrBC-behandelten sowie der nicht behandelten DNA setzte sich folgendermaßen zusammen:

2 µl 10x PCR-Puffer
0,5 µl 10 µM Primer for
0,5 µl 10 µM Primer rev
0,5 µl 10 mM dNTPs
14,3 µl dH₂O
2 µl DNA (ca. 5 ng)
0,2 µl Taq Polymerase

Die Oligonukleotide wurde so gewählt, dass ein Amplifikat ca. 500 ng groß war. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. Denaturierung	95°C	3:00 min	
2. Denaturierung	95°C	0:30 min	} 33 Zyklen
3. Annealing	58°C	0:30 min	
4. Elongation	72°C	0:50 min	
5. Finale Elongation	72°C	5:00 min	
6. Pause	4°C	∞	

2.2.2.1.3. Semiquantitative Analyse der DNA-Methylierung

Die Menge der amplifizierten DNA und mit ihr die methylierungsabhängige Restriktion der genomischen DNA durch McrBC wurden mittels Gel-Elektrophorese auf einem 1,5% Agarose-Gel analysiert. Dafür wurden 15 µl von jedem PCR-Produkt aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Der Anteil der von McrBC geschnittenen DNA wurde semiquantitativ ermittelt, indem die Menge des PCR-Produkts von der McrBC-behandelten DNA in Relation zur DNA-Menge des PCR-Produkts von der unbehandelten DNA gesetzt wurde. Die Voraussetzungen für die semiquantitative Analyse der PCR-Produkte waren durch die gleiche Menge an eingesetzter Matrizen-DNA in den PCR-Reaktionen und die gleiche Anzahl an Zyklen gegeben. Demnach bedeutete eine geringere DNA-Menge im PCR-Produkt von der McrBC-behandelten genomischen DNA im Vergleich zur DNA-Menge im PCR-Produkt von der unbehandelten genomischen DNA eine relativ starke DNA-Methylierung in der untersuchten genomischen Region. War die DNA-Menge in beiden PCR-Produkten gleich, so konnte geschlussfolgert werden, dass die untersuchte genomische Region geringe oder keine DNA-Methylierung trug.

2.2.2.2. Bisulfit-Sequenzierung

Die Bisulfit-Sequenzierung wurde nach einem veränderten Protokoll von Foerster und Mittelsten Scheid durchgeführt (Foerster, A. M. and Mittelsten, Scheid O. 2010). Es ist ein Verfahren, bei dem nichtmethylierte Cytosine zu Uracil desaminiert werden und das die höchstmögliche Auflösung für die Analyse von DNA-Methylierungsprofilen ermöglicht. Dabei werden methylierte Cytosine bei der Bisulfit-Reaktion nicht umgesetzt. Durch nachfolgende PCR-Reaktionen, Sequenzierungs- und statistischen Analysen werden für jedes methylierte Cytosin Grad, Position und Sequenzkontext in genomischen Sequenzen bestimmt (Foerster, A. M. and Mittelsten, Scheid O. 2010, Frommer, M. et al. 1992).

2.2.2.2.1. Bisulfit-Konversion genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus *A. thaliana* nach dem im Kapitel 2.2.1.1.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Um aussagekräftige experimentelle Daten zu erhalten, musste eine möglichst komplette Konversion aller unmethylierten Cytosine erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die Bisulfit-Konversion der genomischen DNA mit dem EpiTect® Bisulfite Kit von Qiagen durchgeführt. Die Anweisungen des Herstellers für die Bisulfit-Konversion wurden dabei befolgt.

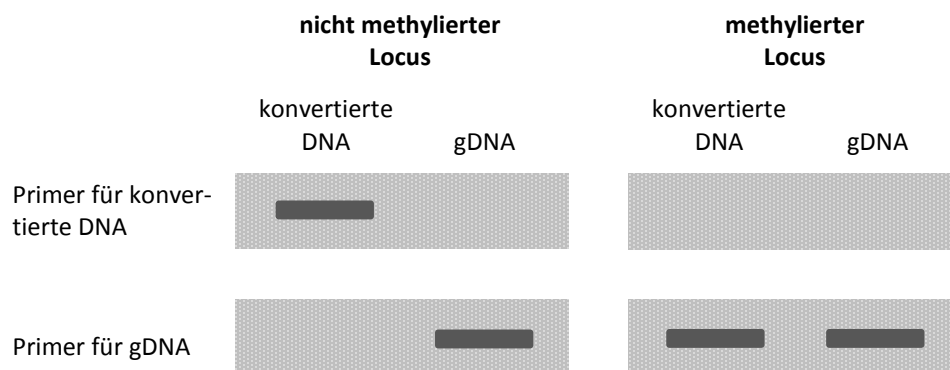


Abbildung 2.3: Ein erwartetes Ergebnis der Kontroll-PCR nach der Bisulfit-Konversion.

Durch die Verwendung zweier Sets von Kontroll-Primern, von denen das eine Primerpaar nur konvertierte DNA bindet und das andere – nicht konvertierte, und die Untersuchung zweier Loci – eines methylierten und eines nicht methylierten – kann die Effizienz der Bisulfit-Konversion überprüft werden.

Anschließend an die Bisulfit-Konversion und bevor mit der Amplifikation von den zu untersuchenden genomischen Regionen fortgefahren wurde, musste die bisulfit-behandelte DNA auf erfolgte Konversion der Cytosine zu Uracil untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein

Kontrollexperiment durchgeführt, das die Amplifikation zweier Loci – eines als nicht methyliert und eines als methyliert bekannt – umfasste und jeweils mit zwei Primerpaaren – eines, das nicht konvertierte DNA und ein zweites, das konvertierte DNA binden (Abbildung 2.3).

2.2.2.2.2. *Primerdesign und Amplifikation der Bisulfit-DNA*

Die Bisulfit-Konversion der DNA führt zur Erzeugung von DNA-Einzelsträngen, die zueinander nicht mehr komplementär sind. Üblicherweise – und so auch in dieser DNA-Methylierungsanalyse via Bisulfit-Sequenzierung – wird der codierende DNA-Strang als Matrix für die Konstruktion von degenerierten Oligonukleotiden verwendet. Bei dieser Art von Oligonukleotiden handelt es sich um ein Primergemisch, das sich aus allen möglichen Kombinationen von Primern zusammensetzt, die an den Positionen der Cytosine eines der beiden Pyrimidine (C oder T) enthalten. Die Anzahl der Primer eines Primer-Gemischs ist also von der Anzahl der Cytosine an seiner Bindestelle in der genomischen DNA abhängig und errechnet sich nach der Formel 2^k (k = Anzahl der Cytosine). Mit der Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden wird also sichergestellt, dass keine Version der bisulfit-behandelten DNA bei der Amplifikation diskriminiert wird.

Ein 25 μ l PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der bisulfit-behandelten DNA setzte sich wie folgt zusammen:

- 3 μ l DNA
- je 1 μ l 10 μ M Primer for und rev (degeneriert)
- 0,7 μ l $MgCl_2$
- 2,5 μ l 10x PCR Puffer
- 2 μ l 10 mM dNTPs
- 0,3 μ l Taq Polymerase
- 14,5 μ l dH_2O

Für die Amplifikation der bisulfit-behandelten DNA von den zu untersuchenden genomischen Regionen wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

1. Denaturierung	95°C	3:00 min	
2. Denaturierung	95°C	0:30 min	} 40 Zyklen
3. Annealing	53°C	0:30 min	
4. Elongation	68°C	1:30 min / 1 kb	
5. Finale Elongation	68°C	10:00 min	
6. Pause	20°C	∞	

Die erhaltenen Amplifikate wurden per Gel-Elektrophorese auf einem 1% Agarose-Gel bei 80 V aufgetrennt und, sofern eine scharfe Bande entsprechend der erwarteten Größe zu sehen war, aus dem Gel extrahiert. Die Gel-Extraktion erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen.

2.2.2.2.3. Klonierung der Amplifikate

Anders als nach einer herkömmlichen PCR, die identische Amplifikate eines DNA-Abschnitts liefert, repräsentiert das Amplifikat einer PCR von der bisulfit-behandelten DNA ein heterogenes Gemisch, welches verschiedene Versionen des amplifizierten DNA-Abschnitts enthält, deren Cytosine mit einer bestimmten statistischen Häufigkeit zu Thyminen konvertiert sind. Für die DNA-Methylierungsanalyse muss diese Statistik aufgestellt werden, welche durch die Klonierung einzelner PCR-Produkte und die Sequenzierung einer bestimmten Mindestanzahl an Klonen erreicht werden kann.

Die Klonierung der PCR-Produkte wurden mit pGEM®-T Easy Vector Systems von Promega durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

2.2.2.2.4. Blau-Weiss-Selektion der Klone und Sequenzierung

Die Selektion positiver Klone erfolgte auf Petrischalen mit LB-Medium, welches mit Ampicilin versetzt worden war. Einzelne Kolonien wurden auf neue Medien ausgestrichen, die Ampicilin, IPTG und X-Gal für die Blau-Weiss-Selektion enthielten (Abbildung 2.4). Die Konzentrationsangaben und Durchführung sind den Anweisungen Promegas für pGEM®-T Easy Vector Systems zu entnehmen.

Nach der Blau-Weiss-Selektion wurden pro Genotyp und untersuchten genomischen Locus 24 weiße Kolonien in 4 ml Flüssigkulturen angeimpft. Die Plasmide mit den klonierten Bisulfit-PCR-Produkten wurden nach der im Kapitel 2.2.1.2.3 beschriebenen Methode isoliert. Je Genotyp und untersuchten Locus wurden 24 Klone sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit vektorspezifischem Primer und als Auftrag an SeqLab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

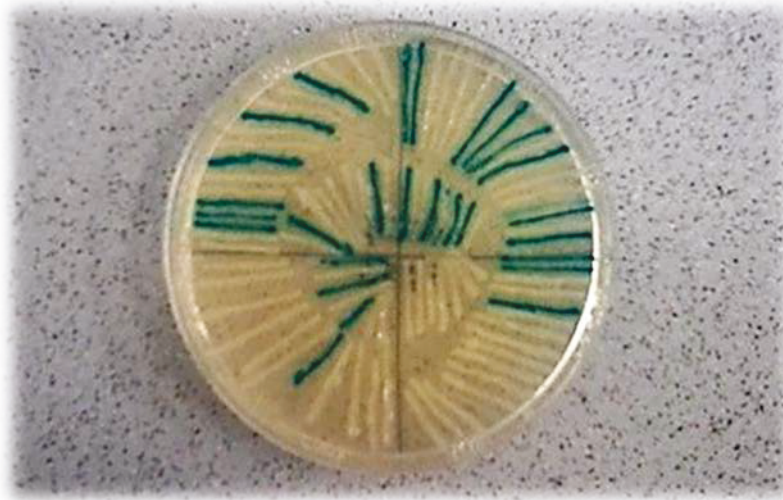


Abbildung 2.4: Blau-Weiss-Selektion der Bisulfit-Klone.

Petrischale mit dem Selektionsmedium LB mit Ampicilin/IPTG/X-Gal zur Selektion von pGEM-T® Easy Vektoren mit klonierten Bisulfit-PCR-Produkten. Positive Kolonien sind weiss, weil durch das Insert die codierende Sequenz von *lacZ* unterbrochen und dessen enzymatische Wirkung am Substrat X-Gal verhindert wird. Bei blauen Kolonien handelt es sich um den religierten Vektor ohne Insert.

2.2.2.2.5. Sequenzierungsanalyse, Sequenzenabgleich und Auswertung

Mit der Konstruktion der degenerierten Oligonukleotide auf der Grundlage des codierenden DNA-Strangs (s. Kapitel 2.2.2.2.2) wurde auch dieser als auf DNA-Methylierung zu untersuchende Strang definiert. Zumal die PCR-Produkte ungerichtet in den pGEM®-T Easy Vektor kloniert wurden, lagen die Inserts bei den sequenzierten Klonen in beiden Orientierungen vor. So wurden entweder der codierende oder der komplementäre DNA-Strang sequenziert. Folglich, bevor die DNA-Sequenzen abgeglichen werden konnten, mussten die komplementären Sequenzierungen nach revers-komplement übersetzt werden. Diese Übersetzung wurde mit dem Online-Programm *Reverse Complement* (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) vollzogen. Anschließend wurden je 24 DNA-Sequenzen mit der jeweiligen Konsensus-Sequenz pro Genotyp und Untersuchungsregion mit *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) in Fasta-Format abgeglichen. Für die DNA-Methylierungsanalyse wurden die Fasta-Dateien in das Online-Programm *CyMATE* (<http://www.cymate.org/>) geladen, das die für die einzelnen Cytosine notwendigen statistischen Informationen lieferte (Hetzl, J. et al. 2007).

2.2.2.3. *Chromatin-Immunopräzipitation*

2.2.2.3.1. *Fixierung des Pflanzenmaterials*

Für den ChIP wurden die Pflanzen bei 16°C und unter kontinuierlichem Licht angezogen. Das Pflanzenmaterial wurde von Pflanzen nach der Ausbildung des Haupttriebes fixiert. Ganze Pflanzen wurden von Erde befreit, mit einer feinen Schere zerschnitten, auf einem Stück Miracloth platziert und mit einer Verschlussklemme zu einem Bündel fest verschlossen. Die Bündel wurden drei Mal in dH₂O gewaschen, dabei das Wasser nach jedem Waschschrift gewechselt und die Bündel leicht ausgedrückt. Nachdem möglichst viel Wasser ausgedrückt wurde, wurden die Bündel in so viel Volumen 1% Formaldehyd getaucht, sodass die Bündel von der Lösung bedeckt wurden. Um die Bündel in der Lösung zu halten, wurde auf sie ein Gewicht gelegt. Zur Fixierung wurde 15 Minuten lang unter Vakuum inkubiert. Um die Fixierung zu stoppen, wurde die Lösung durch Zugabe von 2 M Glycin auf die Endkonzentration von 125 mM gebracht und 5 Minuten unter Vakuum inkubiert. Im nachhinein wurde das Formaldehyd durch dreimaliges Waschen mit dH₂O ausgespült. Das Pflanzenmaterial wurde nach Möglichkeit von Wasser befreit, indem es in einem Papiertuch zusammengedrückt wurde. Das nun trockene Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu feinem Pulver im Mörser zerrieben, ohne dass das Material auftaut. Bis zum Experiment wurde das Material bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2.3.2. *Präparation des Chromatins*

Pro Genotyp wurden parallel 3 Proben mit je 1 g Pflanzenmaterial behandelt. Dies ergab 6 Proben für Mutante und Wildtyp. Zu 1 g gefrorenem Pflanzenmaterial wurde 30 ml Extraktionspuffer 1 zugegeben und sofort gut gemischt, damit das Material im Puffer auftaute, nicht vorher. Nachdem das Material gelöst war, wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch ein Stück Miracloth zwei Mal gefiltert und das Filtrat 20 Minuten unter 4°C bei 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1 ml Extraktionspuffer 2 aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es folgte 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 g. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet in 300 µl Extraktionspuffer 3 gelöst. In ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 300 µl Extraktionspuffer 3 vorgelegt und 300 µl des gelösten Pellets tropfenweise an der Wand entlang auf den sauberen Puffer drauf pipettiert. Anschließend wurde 1 Stunde bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert: durch den Saccharose-Gradienten pelletierten die Nuklei, die obere Schicht enthielt Chloroplasten. Der Überstand wurde abgenommen und das Chromatin-Pellet in

300 µl Nuclei Lysis Puffer gelöst. Hierbei war es wichtig, keine Blasen entstehen zu lassen, da dies die Effizienz Sonifizierung beeinträchtigen würde. 1 µl der Chromatinlösung wurde abgenommen für die spätere Kontrolle der Sonifizierung.

2.2.2.3.3. Sonifizierung des Chromatins

Das Chromatin wurde in speziell für Sonifizierung vorgesehene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 8 Minuten in Intervallen von 30 Sekunden auf Eis sonifiziert. Danach wurde das sonifizierte Chromatin 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 1 µl wurde zur Kontrolle der Sonifizierung (Abb. 2.3) abgenommen, weitere 10 µl für die Gesamt-DNA Kontrolle, den Input. Die Input-DNA Proben wurden bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2.3.4. Bindung des Antikörpers an magnetische Beads

In zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße mit runden Schraubkappen wurden je 180 µl Beads pipettiert. Die Beads wurden unter Verwendung des Magnet Racks drei Mal mit ChIP Dilution Puffer gewaschen. Dazu wurden sie in je 1 ml ChIP Dilution Puffer gelöst, dann am Magneten platziert, sodass sie an den Magneten bindeten und der Puffer abgenommen werden konnte. Der Vorgang wurde 2 weitere Male wiederholt. Nach dem Waschen wurden zu je 180 µl Beads 12 µl Antikörper zugegeben und die Mischung 6 Stunden bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert.

2.2.2.3.5. Präzipitation des Chromatins mit dem Antikörper

Das Volumen der Chromatinlösung wurde mit einer Pipette ermittelt, das bei allen 6 Proben ca. 280 µl beträgt. Jede Probe wurde aufgeteilt in zwei Proben à 140 µl, um die Präzipitationseffizienz zu erhöhen; dies ergab je 6 Proben für Wildtyp und Mutante. Anschließend wurden die 12 Proben auf 1,4 ml mit ChIP Dilution Puffer aufgefüllt. Nach der Inkubation der Antikörper mit Beads wurden sie, wie zuvor, 3 Mal mit ChIP Dilution Puffer gewaschen und in 12 Reaktionsgefäße mit runden Kappen à 30 µl aufgeteilt. Zu je 30 µl Antikörper gebundenen Beads wurde 1,4 ml sonifiziertes Chromatin zugegeben und bei 4°C rollend über Nacht inkubiert.

2.2.2.3.6. Eluierung der Immunokomplexe

Alle Waschschritte erfolgten bei 4°C. Nach der Inkubation des Chromatins mit den Antikörper gebundenen Beads, wurden die Proben im Magnet Rack platziert, sodass die Beads, die nun den Antikörper und das präzipitierte Chromatin gebunden haben sollten, an den Magneten bindeten.

Der Puffer wurde abgenommen und die Beads der Reihenfolge nach je 2 Mal mit Low Salt Wash Puffer, High Salt Wash Puffer und LiCl Wash Puffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Beads in dem jeweiligen Puffer gelöst, 5 Minuten gerollert, danach bei maximal 4.000 rpm kurz abzentrifugiert, an den Magneten gebunden und der Puffer wurde abgenommen. Nachdem der LiCl Wash Puffer nach dem zweiten Waschschrift abgenommen wurde, wurden die Beads am Magneten gelassen, um den letzten Waschschrift mit TE Puffer durchzuführen.

Nach der Abnahme des TE-Puffers wurden die Beads in 500 µl Elution Puffer aufgenommen, gevortext und zur Eluierung der Immunokomplexe 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Da die Beads sich am Boden absetzen, wurden die Proben alle 5 Minuten leicht geschüttelt. Danach wurden die Proben in das Magnet Rack platziert, damit die Beads an den Magneten binden konnten und das Eluat in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß abgenommen werden konnte. Um die Quervernetzung aufzulösen wurden zu jedem Eluat 20 µl 5 M NaCl zugegeben. Außerdem wurden die Input-DNA Proben aufgetaut und mit ChIP Dilution Puffer auf 500 µl Volumen aufgefüllt, zu denen ebenfalls 20 µl 5 M NaCl zugegeben wurde. Alle Proben wurden bei 65°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.3.7. *Fällung der DNA*

Um restliche Proteine loszuwerden, wurde den ChIP- und Input-Proben je 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl pH6,5 und 2 µl 1 µg/µl Proteinase K zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 45°C wurde die DNA mit der PCI-Lösung gefällt. Dazu wurde das gleiche Volumen an PCI zugegeben, gemischt und 5 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, zweifachem Volumen 96% Ethanol und 2 µl Glykogen versetzt. Zur Fällung der DNA wurde eine Stunde bei -70°C inkubiert. Um anschließend die DNA zu pelletieren, wurde eine Stunde bei 4°C und mit 16.000 g zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Pellets der Input DNA und der ChIP Proben wurden jeweils in 20 µl dH₂O aufgenommen.

2.2.2.3.8. *Quantifizierung der immunopräzipitierten DNA mittels qPCR*

Der Erfolg des ChIP-Experiments wurde an der Präzipitation von genomischen Kontrollregionen der Loci *TA3*, *ACTIN*, *BONSAI* und *LINE* beurteilt, gemessen am Input. Um die Präzipitation der DNA der entsprechenden genomischen Kontrollregionen quantitativ zu erfassen, wurde eine quantitative real-time PCR auf ChIP-DNA und Input-DNA durchgeführt.

Für die real-time PCR wurden DNA-Proben 1:50 aliquotiert. Ein 25 µl Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

12,5 µl MESA 10x Mastermix
0,25 µl 10 µM Primer for
0,25 µl 10 µM Primer rev
10 µl dH₂O
2 µl DNA (1:50 verdünnt)

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. Denaturierung 95°C 5:00 Min
2. Denaturierung 95°C 0:30 Min
3. Anealing / Elongation 60°C 1:00 Min
4. Platte Lesen
5. Schmelzkurve 50°C - 95°C, Lesen jeden 0,5°C, 0:01 min anhalten
6. Ende

2.2.3. Anzucht und Arbeiten mit *A. thaliana*

2.2.3.1. Sterilisierung von Samen

Maximal 50 µl Samen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Lösung zur Samensterilisation durch mehrmaliges Invertieren gewaschen und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden in der Sterilbank durchgeführt. Die Lösung wurde abgenommen und durch 0,5 ml 96% Ethanol ersetzt. Durch mehrmaliges Invertieren wurden die Samen noch ein Mal gewaschen und anschließend mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung aufgesaugt und auf einem sterilen Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die Samen in einer Petrischale mit ½ MS-Medium gleichmäßig verteilt, steril verschlossen und für 48 Stunden bei 7°C im Dunkeln aufbewahrt, ehe sie zur Anzucht in die gewünschte Klimasimulationskammer überführt wurden. Zur Selektion von transgenen Individuen mit Resistenz gegen Antibiotika, wurden das Medium mit jenen vorher versetzt.

2.2.3.2. *Anzucht von A. thaliana*

Nach 3 Wochen in axenischer Kultur wurden Keimlinge auf Erde pickiert und, falls nicht anders angegeben, bei 16 Stunden Langtag-Bedingungen bei 20°C kultiviert.

2.2.3.3. *Transformation von A. thaliana durch A. tumefaciens*

Für Transformationen von *A. thaliana* mit Expressionskonstrukten wurden die Pflanzen bei Langtagbedingungen angezogen. Nach der Ausbildung des Haupttriebs und um die Häufigkeit transformierter Gametophyten zu maximieren, wurden bei den Pflanzen die Haupttriebe abgeschnitten, woraufhin sich neue Seitentriebe gebildet hatten. Durch diese Vorgehensweise wurde die Anzahl der transformierbaren Infloreszenzen erhöht. Vor einer Transformation wurden alle bereits gebildeten Schoten und offenen Blüten abgeschnitten, um den späteren Hintergrund an nicht transformierten Samen zu minimieren. Zur Transformation der Pflanzen mit *A. tumefaciens* wurden die Infloreszenzen kurz in die Transformationslösung getaucht. Die weitere Kultivierung erfolgte ebenfalls unter Langtagbedingungen.

Die Selektion der transgenen Individuen erfolgte nach demselben Prinzip wie die Etablierung von *ibm1* Mutanten. Die klonierten DNA Konstrukte codieren die Resistenz für das Antibiotikum Hygromycin, das den axenischen Selektionsmedien zugegeben wurde.

2.2.3.4. *Kreuzung von A. thaliana Individuen*

Die klassische und zugleich eine der ältesten Methoden der Pflanzengenetik ist die Kreuzung zweier Individuen, um deren genetische Kontexte zu kombinieren. In dieser Arbeit wurden durch Kreuzungen von *A. thaliana* die Doppelmutanten *ibm1-5 cal*, *ibm1-12 cmt3* und *ibm1-11 ft-13* erzeugt sowie das Transgen *pFT::GUS* in den genetischen Hintergrund von *ibm1-12* Mutanten gebracht. Zu den benötigten Geräten und Instrumenten gehörten ein Stereomikroskop und eine sehr feine Laborpinzette. Es wurde unter 10-facher Vergrößerung gearbeitet. Für die Kreuzung wurden noch unbefruchtete Blüten des Individuums gebraucht, dessen weibliche Gametophyten mit dem Pollen eines anderen Individuums künstlich bestäubt wurden. Zuerst wurde das Fruchtblatt freigelegt, indem alle Staub- und Kronblätter entfernt wurden. Dabei wurde geachtet, dass es zu keiner ungewollten Selbstbefruchtung kommt. Nach dieser Prozedur wurden die Pflanzen zwei Tage lang weiter kultiviert, in denen das Fruchtblatt auswuchs. Nach diesen zwei Tagen wurde der Pollen des anderen Individuums auf die Narbe des Fruchtblatts des emaskulierten Individuums übertragen.

2.2.3.5. GUS-Färbung

Die spatiotemporale Untersuchung der Expression von *IBM1* und *FT* in den transgenen Linien *IBM-GUS* und *pFT::GUS* wurde durch die Zugabe des Substrats X-Gluc durchgeführt, das durch die exprimierte bzw. postranslational fusionierte β -Galactosidase umgesetzt wird (Jefferson, R. A. et al. 1987). Das zu untersuchende Pflanzengewebe wurde abgetrennt, mit Wasser gespült und von externen Verunreinigungen befreit. Danach wurde das Gewebe für 15 Minuten und unter Vakuum in der GUS-Inkubationslösung inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe für einen variablen Zeitraum in der GUS-Färbelösung bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Statistische Analysen

Die Analysen zur Signifikanz zweier Mittelwerte bei der Untersuchung von Genexpression und Organanzahl wurden mit dem Zweistichproben-t-Test nach R. A. Fisher durchgeführt. Die Signifikanz-Tests wurden mit Hilfe der Software DataLab von Epina GmbH, Pressbaum durchgeführt. Zuerst wurden die Varianzen zweier Stichproben mit einem Zweistichproben-F-Test verglichen und anschließend mit dem Zweistichproben-t-Test die Signifikanz der Unterschiede zweier Mittelwerte untersucht.

Der Zweistichproben-t-Test gibt am Ende an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmter Effekt nicht vorhanden ist. Diese Wahrscheinlichkeit wird für gewöhnlich als der p-Wert bezeichnet. Im Falle eines Vergleichs zweier Mittelwerte drückt der p-Wert die Wahrscheinlichkeit dafür aus, dass die Unterschiede zweier Mittelwerte zufällig sind. In der Wissenschaft werden die Signifikanzniveaus willkürlich definiert, wobei es zur Konvention wurde, folgende Niveaus zu verwenden, welche auch in dieser Arbeit bei der Angabe der Signifikanz verwendet wurden:

*	bedeutet $0,01 < p \leq 0,05$	knapp signifikant
**	bedeutet $0,001 < p \leq 0,01$	signifikant
***	bedeutet $p \leq 0,001$	hoch signifikant

2.2.5. Microarray-Analyse

Material:

Es wurden der Wildtyp Ws-0 und *ibm1-12* Mutanten verwendet. Die primären Infloreszenzen von acht Wochen alten Pflanzen unter Langtag-Bedingungen wurden abgeschnitten und alle offenen und geschlossenen Blüten entfernt, sodass das SAM inklusive der Blütenanlagen angereichert wurde.

Probenvorbereitung:

Aus dem geernteten Gewebe wurde die RNA mittels RNeasy®-Kit von *Qiagen* isoliert. Die Anleitung für die Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe wurde befolgt. Insgesamt wurden vier Proben vorbereitet – jeweils zwei Replikate des Wildtyps und der *ibm1* Mutante.

Probenverarbeitung:

Die RNA-Proben wurden von imaGenes GmbH durchgeführt. Es wurde der 4 x 44K single color *Arabidopsis Gene Expression Microarray* V4 von *Agilent Technologies* verwendet mit vier Arrays auf einem Objektträger, auf dem je 43.803 Proben von *A. thaliana* repräsentiert sind.

Datenanalyse:

Die bioinformatische Analyse wurde von Dipl. Bioinf. Phillip Kroll durchgeführt. Es wurde *Agilents* GeneSpring GX Software verwendet. Zur Identifizierung von in *ibm1-12* Mutanten regulierten Genen wurden folgende Parameter verwendet:

- *Fold change* $\geq 2,0$
- *Entity List: Filtered on Error - CV* $< 50,0$ percent
- *Interpretation: group*
- *Fold-Change cut-off: 2,0*
- *Pairing option: Pairs of conditions*
- *Condition pairs: [Ws] vs [ibm1]*
- *Minimum number of pairs: 1 out of 1 condition pairs*
- *Technology: Agilent, SingleColor, 21169*

Die Listen mit normalisierten Expressionsdaten wurden aus GeneSpring GX zur weiteren Datenaufbereitung in Excel importiert. Zur Berechnung von Expressionsunterschieden für alle Gene wurde die normalisierte Expression von jeweils zwei Replikaten des Wildtyps und der Mutante gemittelt und log2 von der errechneten Differenz berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der *ibm1-12* Mutante

In einer Studie von Mutanten mit ektopischer DNA-Methylierung am Locus *BONSAI* wurde die *increase in bonsai methylation 1 (ibm1)* Mutante identifiziert (Saze, H. et al. 2008a). Die Mutanten entwickelten morphologische Phänotypen, die erst nach mehrfacher Selbstung der *ibm1* Mutanten offensichtlich werden (Saze, H. et al. 2008a). Der pleiotrope Phänotyp von *ibm1* Mutanten äußert sich durch kleine, schmale Blätter, arretierte Blütenentwicklung und reduzierte Fertilität aufgrund von Pollendefekten. Im Rahmen einer reverse Genetik Studie von Histon-Demethylase-Mutanten mit Entwicklungsdefekten der Zellidentität wurden in meiner Diplomarbeit (Gregor Klein, 2008, Diplomarbeit) drei neue *ibm1* Allele identifiziert, die bereits in der ersten homozygoten Generation Defekte in der Entwicklung von floralen Meristemen zeigten. Die neuen *ibm1* Allele entwickeln zu Infloreszenzmeristemen (IM) revertierte floralen Meristeme (FM) – ein Ereignis, das als florale Reversion interpretiert werden kann und im Wildtyp nicht vorkommt. Der neue Phänotyp sollte charakterisiert werden, um daraus auf die Funktion von *IBM1* in der Entwicklung von *A. thaliana* schließen zu können.

3.1.1. Eigenschaften der *ibm1* Mutation

Die in der Arbeit verwendeten *ibm1* Mutanten wurden durch ungerichtete Transformation von *A. thaliana* mit T-DNA durch *Agrobacterium tumefaciens* generiert, deren Samen von Samenbanken und T-DNA Kollektionen bezogen wurden (Samson, F. et al. 2002, Scholl, R. L. et al. 2000). Die T-DNA unterbricht die native genomische DNA-Sequenz und kann zur Unterbre-

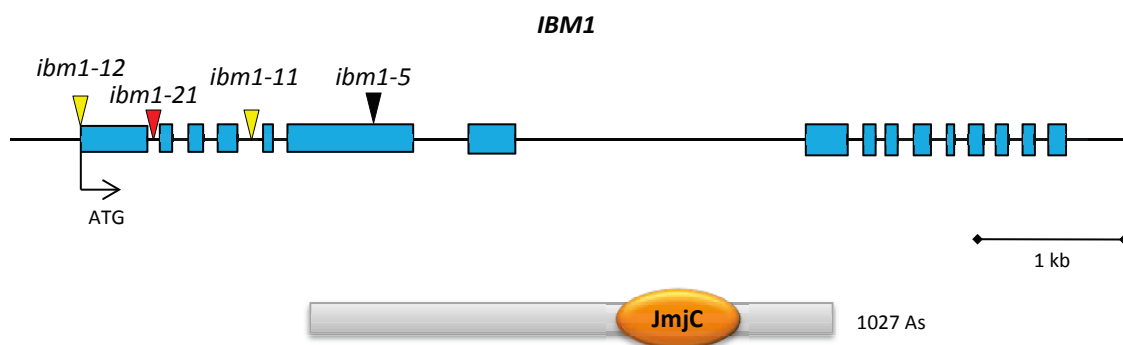


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von *IBM1* und der verwendeten Allele.

Die codierenden DNA-Abschnitte, Exons, sind durch blau farbene Rechtecke dargestellt, die nicht codierenden DNA-Abschnitte, Introns – als durchgezogene Linie. Die Positionen der Markierungen entsprechen den Insertionsstellen der T-DNA. Die Farben der Markierungen geben den Ökotyp von *A. thaliana* an, in dem die T-DNA-Mutanten generiert wurden: gelb - Wassilewskija, schwarz - Columbia, rot - Landsberg *erecta*. Darunter, schematische Darstellung des *IBM1* Proteins mit der katalytischen Domäne JmjC mit H3K9me2-Demethylase-Aktivität (Inagaki, S. et al. 2010, Tsukada, Y. et al. 2006).

chung des Transkripts führen. Insbesondere, wenn die Insertion im Exon liegt, sinkt die Wahrscheinlichkeit der Produktion eines funktionsfähigen Proteins im Gegensatz zur Insertion im Intron, in welchem Fall das Transgen mit dem Intron gespleisst werden kann. Es sind insgesamt neun Allele von *ibm1* etabliert und phänotypisch untersucht worden, die sich in drei verschiedenen Ökotypen, Wassilewskija (Ws), Columbia (Col) und Landsberg *erecta* (Ler), von *A. thaliana* befinden. Die Allele mit dem stärksten Phänotyp wurden für alle nachfolgenden Experimente in dieser Arbeit selektiert (Abbildung 3.1). Die hemizygoten Individuen entwickelten keine offensichtlichen morphologischen Defekte. Insoweit beruht der Phänotyp auf einer rezessiven Ausprägung der Mutation von *IBM1*.

Die transkribierte Sequenz von *IBM1* ist 6,7 kb lang, besteht aus 16 Exons und codiert ein Protein aus 1027 Aminosäuren. Im carboxyterminalen Teil beinhaltet das Protein eine funktionelle Jumonji C (JmjC) Domäne mit Demethylase-Aktivität für H3K9me2 (Inagaki, S. et al. 2010). Die Allele *ibm1-12* und *ibm1-11* wurden im Rahmen der reverse Genetik Studie isoliert, sind beide im genetischen Hintergrund des Ökotyps Ws etabliert und entwickeln Transformationen der lateralen floralen Meristeme zu sekundären Infloreszenzen bereits in der ersten Generation, in der die T-DNA Insertion im homozygoten Zustand vorliegt. Das Allel *ibm1-5* ist im Ökotyp Col erzeugt. Ein weiteres Allel, *ibm1-21*, ist im Ökotyp Ler generiert. Keines der Allele in den Ökotypen Col und Ler entwickeln den Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten.

3.1.2. Der Phänotyp von *ibm1* Mutanten

Der Phänotyp von *ibm1* Mutanten ist pleiotrop, aber reproduzierbar. Die jungen *ibm1* Keimlinge unterscheiden sich vom Wildtyp nicht. Die während der vegetativen Entwicklung ersten offensichtlichen Phänotypmerkmale von *ibm1* Mutanten erscheinen in der Farbe und Struktur der Rosettenblätter (Abbildung 3.2 A, B). Die Rosettenblätter von *ibm1* Mutanten sind eines dunkleren grünen Farbtons, sie unterscheiden sich durch schmalere, kürzere Form und sind um ihre Längsachse zur abaxialen Seite gewölbt.

Als Folge der etwas längeren vegetativen Phase entwickeln die *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten unter Langtag-Bedingungen drei bis vier Rosettenblätter mehr (Abbildung 3.2 C). Nach der Blühinduktion sind bei beiden *ibm1* Allelen im Ökotyp Ws Entwicklungsdefekte bei der Produktion von lateralen Organen an der Infloreszenz zu erkennen. Das primäre IM von *ibm1-12* Mutanten produziert eine erhöhte Anzahl von Hochblättern, wohingegen das primäre IM des

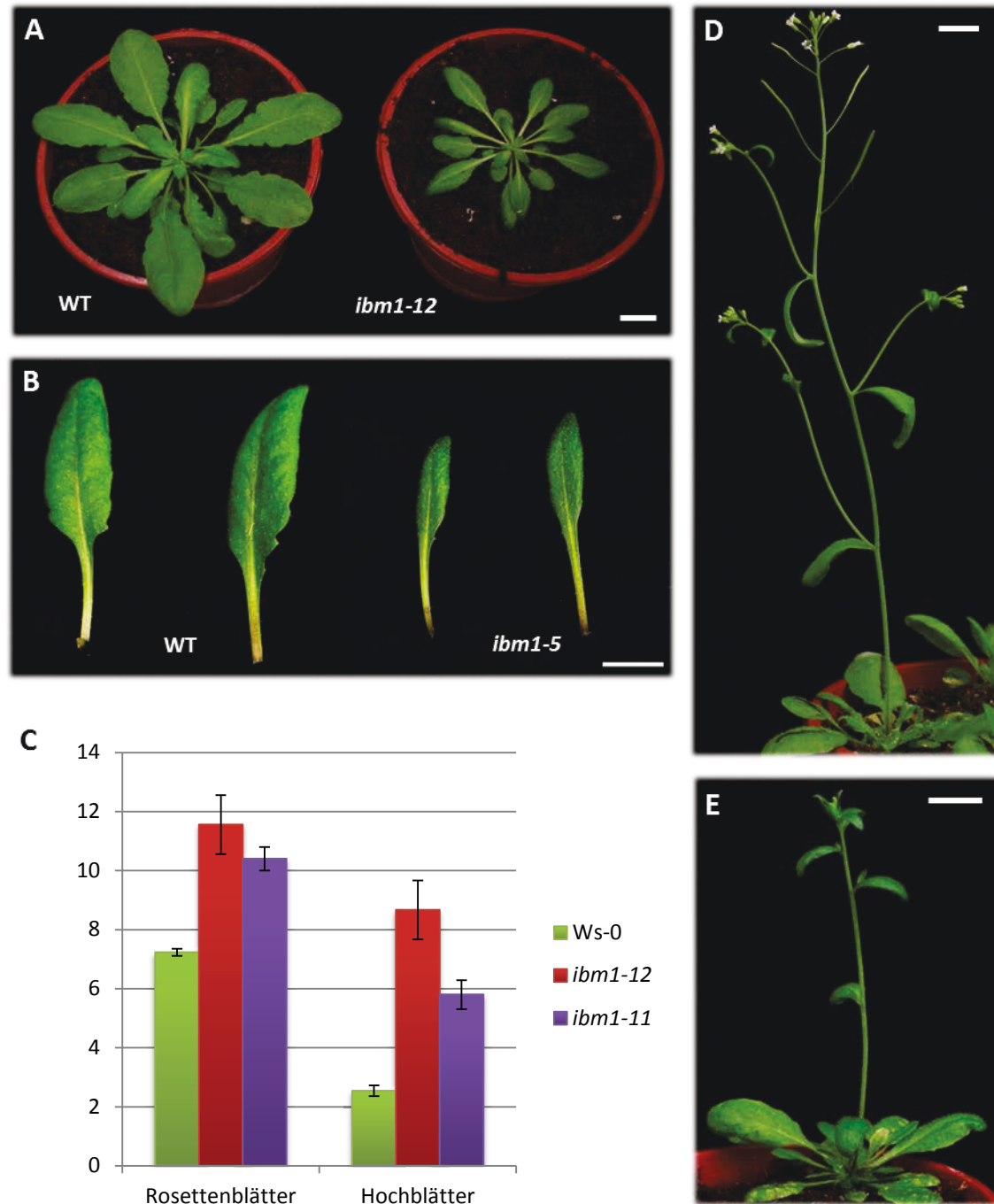


Abbildung 3.2: Der Phänotyp von *ibm1* Mutanten.

A. Rosettenblätter von fünf Wochen alten *ibm1-12* Mutanten und dem korrespondierenden Wildtyp Ws unter 8 Stunden Kurztag-Bedingungen und **B.** jeweils Rosettenblätter 9 und 10 von *ibm1-5* Mutanten und dem korrespondierenden Wildtyp Col. Die Blätter der Mutanten unterscheiden sich durch eine dunklere Färbung. Die Form der Blätter von *ibm1* Mutanten ist schmaler, die Blattfläche geringer, die Blätter haben eine schmalere und kürzere Form und sind um ihre Längsachse zur abaxialen Seite gewölbt. **C.** Blühzeitpunkt von *ibm1* Mutanten. Unter Langtag-Bedingungen blühen *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten später. Beide *ibm1* Allele entwickeln mehr Hochblätter als der Wildtyp. Es sind die Anzahl der entwickelten Rosettenblätter vor der Blühinduktion und die Anzahl der gebildeten Hochblätter auf der primären Infloreszenz unter Langtag-Bedingungen dargestellt. (n = 20, Standardfehler.) **D.** Habitus eines sieben Wochen alten Wildtyps Ws und **E.** einer gleich alten *ibm1-12* Mutante.



Abbildung 3.3: Florale Reversion bei *ibm1-12* Mutanten.

ibm1-12 Mutanten entwickeln florale Reversion. **A.** Infloreszenz eines sieben Wochen alten *A. thaliana* Wildtyps unter Langtag-Bedingungen. **B.** und **C.** Infloreszenz einer acht Wochen alten *ibm1-12* Mutante unter Langtag-Bedingungen. FM revertieren zu IM, sekundäre Sprossachsen werden gebildet ohne begleitendes Hochblatt an der Basis (rote Markierungen). Vegetative Strukturen, Brakteen (gelbe Markierungen), werden nach dem Übergang zur Blütenentwicklung produziert. **D.** Florale Reversion am Beispiel einer *ibm1-12* Blüte. Ein FM revertiert zu einem IM, wahrscheinlich eine Transformation von Sepalen zu einem IM – ein mit *ap1* Mutanten vergleichbarer Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990, Koornneef, M. et al. 1991).

Wildtyps zwei bis drei Hochblätter produziert, in deren Achseln die sekundären IM gebildet werden (Abbildung 3.2 C, D, E). Sprossaufwärts findet beim Wildtyp der Übergang zur Entwicklung von Blüten statt, die durch Selbstbefruchtung zu Schoten auswachsen, die die Samen der nächsten Generation beinhalten. Die Transformation des Sprossapikalmeristems zur Produk-

tion von Blüten ist im Wildtyp bis zum Generationsende endgültig. Bei *ibm1-12* Mutanten erfolgt bei der Entwicklung der primären Infloreszenz keine zeitliche Trennung zwischen der Produktion von vegetativen und reproduktiven Strukturen. Alterierend produziert das primäre IM infertile Blüten, denen sprossaufwärts zu IM revertierte FM folgen (Abbildung 3.3 B, C). Im Wildtyp wird ein sekundäres IM in der Achsel eines Hochblatts entwickelt, welches jedoch bei der Anlage eines FM rudimentär bleibt (Long, J. and Barton, M. K. 2000). Bei der Entwicklung von lateralen Organen an der Infloreszenz von *ibm1-12* Mutanten weisen fehlende Hochblätter an der Basis von sekundären IM (Abbildung 3.3 B, C; rote Pfeile) auf die Reversion eines FM zu einem IM hin. Die revertierten FM sind bei *ibm1-12* Mutanten auch durch die Produktion von Brakteen anstelle von Sepalen, die den Blütenorganen des ersten Wirtels eines FM entsprechen, zu erkennen (Abbildung 3.3 B, C; gelbe Pfeile). Diese Meristemidentitätsdefekte sind von *ap1* Mutanten bekannt. Mutationen von *AP1* resultieren in der Transformation von Sepalen zu blattähnlichen Organen, während Organe des zweiten Wirtels nicht oder in wenigen Fällen zu petaloiden Organen entwickelt werden (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990). Vereinzelt sind an Blüten von *ibm1-12* Mutanten weitere Phänotypen zu erkennen, die ebenfalls von *ap1* Mutanten bekannt sind. Anstelle von regulären Sepalen des ersten Wirtels werden sekundäre Blüten oder Infloreszenzen produziert (Abbildung 3.3 D) (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990, Mandel, M. A. et al. 1992). Bei diesen Meristemidentitätsdefekten kehrt ein FM zur chronologisch früheren Meristemidentität eines IM zurück oder es produziert sekundäre Blüten. Daher können beide Phänotypen als florale Reversion interpretiert werden.

3.1.3. Quantifizierung von lateralen Organen an der primären Sprossachse bei *ibm1-12* Mutanten

Wegen der hohen Variabilität des Phänotyps von *ibm1-12* Mutanten wurden die Merkmale des Phänotyps quantifiziert und eine Statistik zur floralen Reversion erstellt. Dazu wurde eine qualitative und quantitative Analyse aller an der primären Sprossachse lateral gebildeten Organe durchgeführt (Abbildung 3.4). Um die Entwicklungsdefekte quantitativ zu erfassen, wurden je zehn Individuen pro untersuchten Genotyp unter Langtag-Bedingungen ausgewertet. Die Erfassung enthielt die vor der Blühinduktion gebildeten Rosettenblätter und alle nach der Blühinduktion vom Sprossapikalmeristem gebildeten Organe in chronologischer Reihenfolge. Als Referenz diente der Wildtyp des Ökotyps Ws, in dessen Hintergrund die untersuchten *ibm1* Allele isoliert wurden, sowie der Wildtyp aus der segregierenden Population des *ibm1-11* Allels. Dabei entsprach jede segregierende Population der Nachkommenschaft einer einzelnen heterozygoten

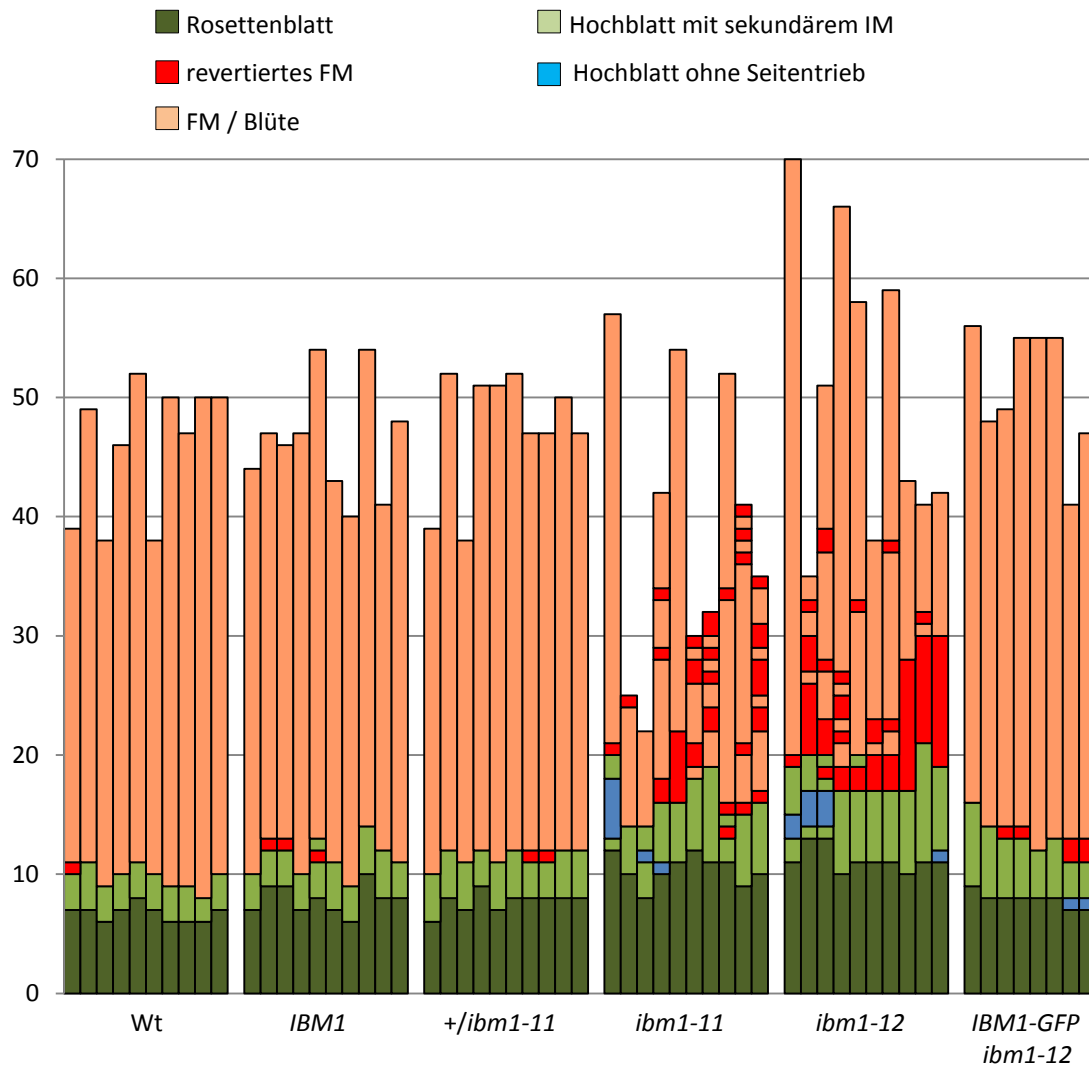


Abbildung 3.4: Entwicklung von Organen an der primären Sprossachse bei *ibm1* Mutanten.

Chronologische Abfolge der Organentwicklung vom Sprossapikalmeristem von *ibm1* Mutanten unter Langtag-Bedingungen. Aufzeichnung von unten nach oben von zehn Individuen jeden Genotyps. Revertierte FM sind rot dargestellt. Die Einheit der Y-Achse entspricht der Anzahl der entwickelten Organe an der primären Sprossachse.

Pflanze. Basierend auf der Genotypisierung durch PCR wurden sowohl homozygote *ibm1-12* Mutanten als auch hemizygot und homozygote Individuen des *ibm1-11* Allels ausgewertet.

Bei der Analyse der Organentwicklung an der primären Sprossachse wurde als revertiertes FM jedes einzelne laterale Organ an der primären Sprossachse gewertet, bei dem ein FM zum IM revertierte, das ohne unterstehendes Hochblatt entwickelte, ein FM vegetative Strukturen, Brakteen, produzierte oder ein IM nach einem FM entwickelt wurde (Abbildung 3.3 B, C). Bis auf den Phänotyp, bei dem ein IM ohne unterstehendes Hochblatt an den ersten Nodien produziert wird, treten die beschriebenen Phänotypen beim Wildtyp nicht auf. Im Wildtyp sind IM ohne

unterstehendes Hochblatt vereinzelt und nur an den ersten Nodien anzutreffen, die in der Abbildung 3.4 zu „revertierten FM“ gezählt werden. Auch die Wildtypen aus den segregierenden Populationen der zwei *ibm1* Allele und hemizygoten *+/ibm1-11* Mutanten entwickeln vereinzelt IM ohne Hochblatt unter den ersten Nodien. Während der weiteren Entwicklung der Infloreszenz produziert das Sprossapikalmeristem des Wildtyps und der hemizygoten *+/ibm1-11* Mutanten ausschließlich fertile Blüten. Ausnahmslos alle untersuchten *ibm1-12* Mutanten entwickeln an den ersten Nodien ein oder mehrere indeterminierte FM. Bei sieben von zehn untersuchten *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten produziert das primäre IM zu IM revertierte FM nach der Ent-

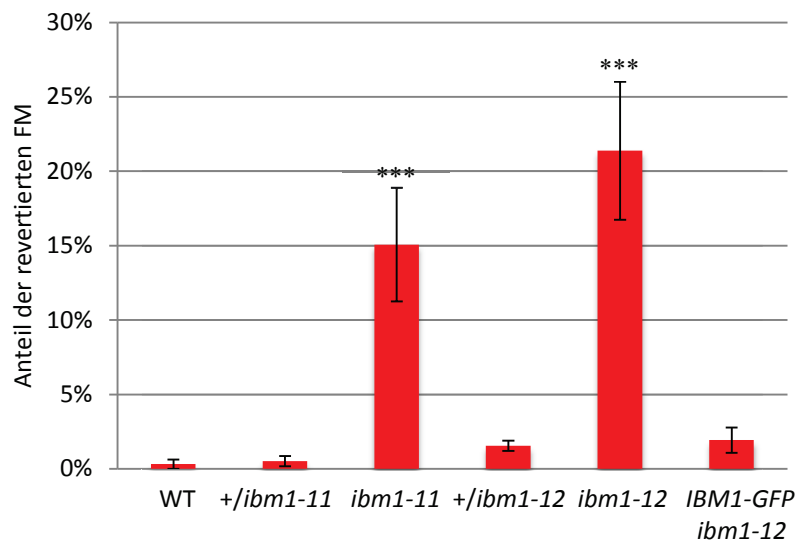


Abbildung 3.5: Anteil der transformierten FM bei *ibm1* Mutanten.

Durchschnittlicher Anteil der transformierten FM an der primären Sprossachse pro Individuum, errechnet aus der Gesamtzahl der lateralen Organe an der primären Sprossachse. Im Durchschnitt sind 15% der FM an der primären Sprossachse von *ibm1-11* und 21% von *ibm1-12* Mutanten zu IM transformiert (n = 10 Individuen pro Genotyp, p < 0,001, basierend auf den Daten wie Abbildung 3.4.)

wicklung von Blüten. Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem der Übergang zur Entwicklung von Blüten bis zum Ende des Lebenszyklus stabil ist, ist bei *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität nicht gegeben. Es werden abwechselnd arre- tierte Blüten und zu IM revertierte FM entwickelt.

Basierend auf derselben Stichprobe von Pflanzen wurde der Anteil der transformierten FM zu der Gesamtzahl aller an der primären Sprossachse gebildeten lateralen Organe berechnet. Die quantitative Auswertung der lateralen Organe ergab bei *ibm1-11* Mutanten einen Anteil von 15% und bei *ibm1-12* Mutanten einen Anteil von 21% an zu IM transformierten FM (Abbildung 3.5).

3.1.4. Ökotyp gebundene florale Reversion von *ibm1-12* Mutanten

Die phänotypische Analyse der *ibm1* Allele in den Ökotypen Ws, Col und *Ler* ergab, dass die florale Reversion nur in den *ibm1*-Allelen des Ökotyps Ws auftritt, jedoch weder im Ökotyp Col, noch in *Ler*. Diese Beobachtung basiert auf der phänotypischen Auswertung von vier *ibm1*-Allelen des Ökotyps Col und einem *ibm1*-Allel des Ökotyps *Ler*. Die *ibm1-5* (Col) und *ibm1-21* Mutanten (*Ler*) entwickeln keine revertierten FM und keine florale Reversion (Abbildung 3.6 A). Der Rosettenblattphänotyp (Abbildung 3.2 A, B) und der etwas spätere

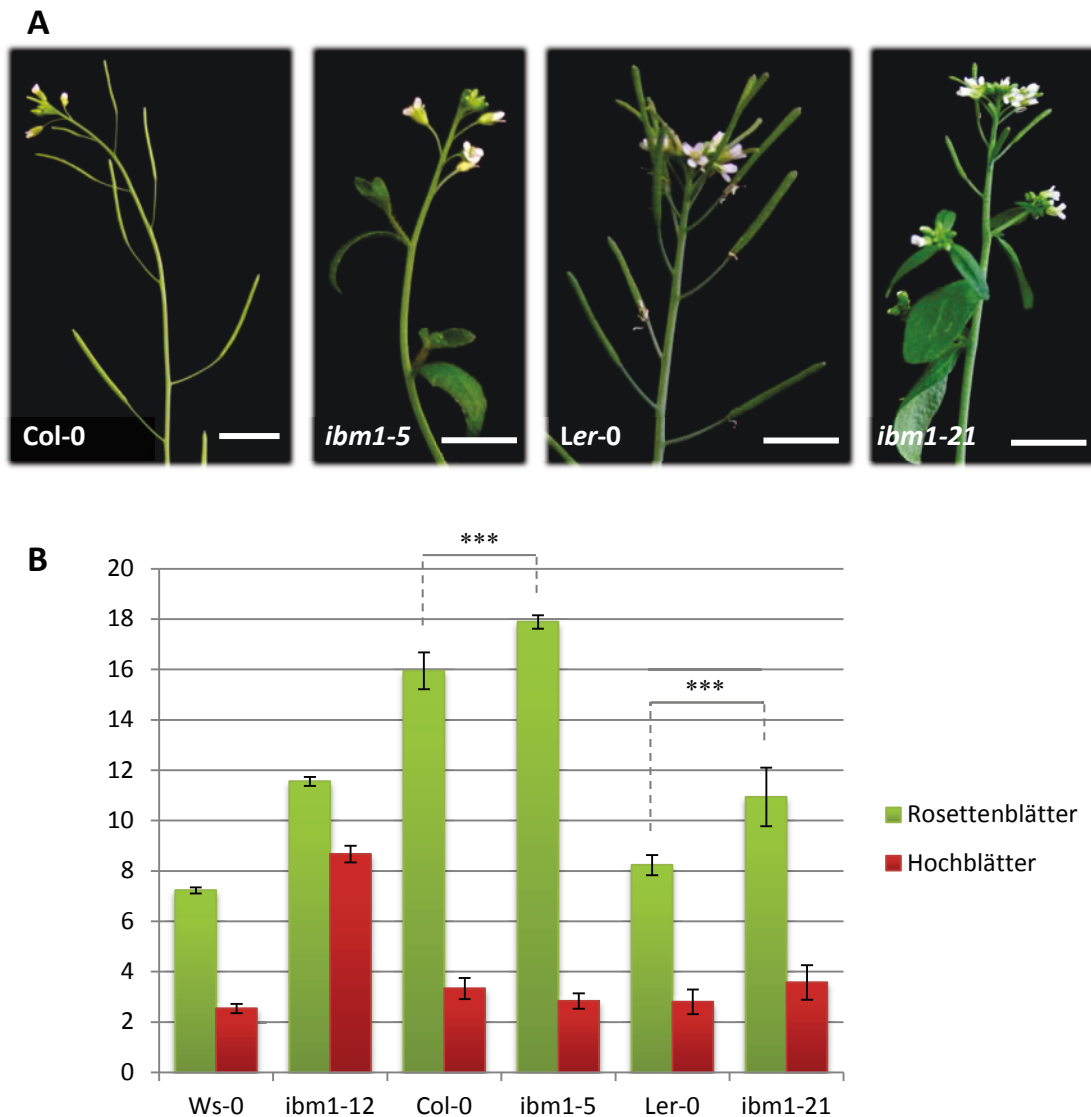


Abbildung 3.6: *ibm1* Mutanten in den Ökotypen Col und *Ler* entwickeln keine transformierten FM. **A.** Die Infloreszenzen stammen von sieben Wochen alten *A. thaliana*. Die Infloreszenzen von *ibm1* Allelen in den Ökotypen Col und *Ler* entwickeln keine transformierten FM. **B.** Blühzeitpunkt und Anzahl der Hochblätter von *ibm1*-Allelen in den Ökotypen Ws, Col und *Ler*. Nur das Allel *ibm1-12* im Ökotyp Ws entwickelt eine erhöhte Anzahl an Hochblättern. ($n = 20$ Individuen, Standardfehler, $p < 0,001$.)

Blühzeitpunkt treten in *ibm1* Mutanten im Hintergrund von allen drei Ökotypen auf (Abbildung 3.6 B). Die in *ibm1-12* Mutanten erhöhte Anzahl von Hochblättern und revertierte FM sind Phänotypmerkmale, die nur für *ibm1*-Allele im Ökotyp Ws spezifisch sind.

3.1.5. Die Rolle von *CAULIFLOWER* in der *IBM1* vermittelten Regulation der Meristemidentität

Die *ibm1-12* Mutante wurde in der reverse Genetik Studie entdeckt, deren Ziel es war, nach Entwicklungsdefekten in der Differenzierung bei Mutanten aller Histon-Demethylasen von *A. thaliana* zu suchen. Alle Mutanten wurden in Form von T-DNA Insertionslinien bezogen (s. Kapitel 3.1.1). Mehrere verschiedene Institute sind an der Generierung solcher Mutanten beteiligt. Zum einen greifen die Institute The Salk Institute for Biological Studies, USA und INRA Versailles auf verschiedene Arten der T-DNA bei der Generierung von Mutanten zurück, welche von *A. tumefaciens* zur Transformation von *A. thaliana* verwendet werden. Zum anderen wurden zur Generierung von Mutanten unterschiedliche Ökotypen von *A. thaliana* verwendet. Vom Salk Institute wird der Ökotyp Columbia (Col) verwendet, während INRA den Ökotyp Wassilewskija (Ws) nutzte.

Im Wildtyp des Ökotyps Ws ist das Gen *CAL* mutiert, was wahrscheinlich zur Produktion eines aberanten Proteins führt (Kempin, S. A. et al. 1995). Während *cal* Mutanten keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp haben, verstärkt die *cal* Mutation den Infloreszenzphänotyp von *ap1* Mutanten, was in *ap1 cal* Doppelmutanten zur Transformation von FM zu IM führt (Ditta, G. et al. 2004). Daraus ergab sich die Annahme, dass *cal-1*, das natürliche Allel in Ws, den Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten verstärkt. Im Umkehrschluss ergab sich die Hypothese, dass der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-5* im Ökotyp Col durch das funktionsfähige *CAL* Gen unterdrückt wird. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die *cal-6* Mutation im *ibm1-5* Allel im Ökotyp Col eingeführt. Die Herstellung von *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten erfolgte durch Kreuzung der *cal-6* Mutante mit der hemizygoten *+/ibm1-5*.

Die Analyse des Phänotyps vom *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten im Ökotyp Col sollte Aufschluss darüber liefern, ob die Entwicklungsdefekte der Infloreszenz, die florale Reversion, durch die *cal-6* Mutation verstärkt werden. Es wurden die Doppelmutanten aus den segregierenden F3 Populationen der *ibm1-5* x *cal-6* Kreuzung untersucht. Die *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten entwickeln einen vergleichbaren Phänotyp der Infloreszenz wie die *ibm1-12* Mutanten im Ökotyp Ws mit dem natürlich vorkommenden *cal-1* Allel (Abbildung 3.7). Dem Übergang zur Blütenentwicklung kommen unter den ersten Nodien der primären Sprossachse indeterminierte

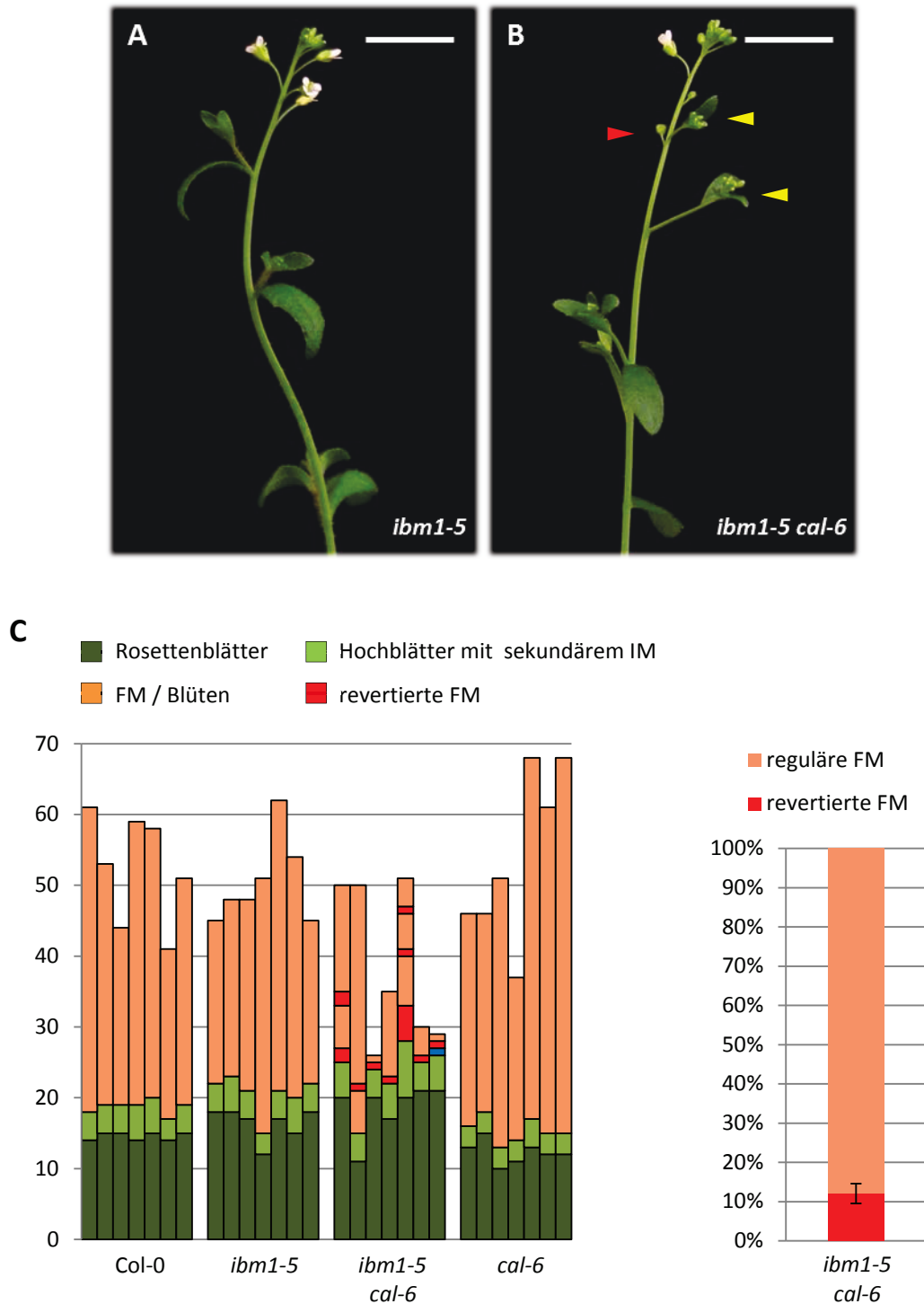


Abbildung 3.7: Die *cal-6* Mutation verstärkt den Phänotyp von *ibm1-5* Mutanten.

A. Die Infloreszenzen stammen von sieben Wochen alten Pflanzen. *ibm1-5* Mutanten im Ökotyp Col entwickeln keine florale Reversion. **B.** *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten entwickeln florale Reversion, vergleichbar mit *ibm1-12* Mutanten im Ökotyp Ws. **C.** Sequenz der vom Sprossapikalmeristem gebildeten Organe. Die *ibm1-5* und die *cal-6* Mutanten entwickeln keine revertierten FM. *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten entwickeln transformierte FM vergleichbar mit *ibm1-12* Mutanten im Ökotyp Ws. (n = 7 Individuen pro Genotyp.) Rechts ist der Anteil der revertierten FM an der primären Sprossachse in *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten dargestellt.

FM ohne begleitendes Hochblatt zuvor (Abbildung 3.7 B, gelbe Markierung). Nach der Entwicklung von Blüten revertiert das primäre IM zur Entwicklung von weiteren lateralen indeterminierten FM (Abbildung 3.7 B, gelbe Markierung). Frühe Blüten werden unvollständig entwickelt und reifen nicht zur Reproduktionsfähigkeit heran (Abbildung 3.7 B, rote Markierung). Da *cal* Mutanten weder im Ökotyp Col, noch in Ws einen offensichtlichen morphologischen Phänotyp haben, deutet der Phänotyp von *ibm1-5 cal-6* Doppelmutanten darauf hin, dass das intakte *CAL* Gen im *ibm1-5* Allel den Infloreszenzphänotyp maskiert.

3.1.6. Komplementation der *ibm1-12* Mutante

Die bei den *ibm1* Mutanten zugrunde liegenden Mutationen handelt es sich um T-DNA-Insertionen in *IBM1*, welche durch Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* generiert wurden (s. Kapitel 3.1.1). Bei der Transformation kann es zu Integrationen mehrerer T-DNA Kopien am selben oder an verschiedenen Loci kommen. Um transgene Linien mit einfacher Kopie von den Linien mit mehrfachen, unabhängig segregierenden Kopien zu isolieren, wurde bei den *ibm1* Allelen die Segregation der T-DNA in den nachfolgenden Generationen untersucht. Die Segregation konnte mit Hilfe der Verwendung des Antibiotikums Kanamycin ermittelt werden, dessen Resistenz auf der T-DNA codiert ist. Auf Kanamycin haltenden axenischen Medien konnten resistente Individuen von sensitiven visuell unterschieden werden. Nur transgene Linien mit der Segregation von drei zu eins, die dem monohybriden Mendelschen Erbgang entsprechen, wurden als Ausgangsmaterial für alle weiteren Experimente verwendet.

Um sicherzustellen, dass der mutante Phänotyp ausschließlich auf der Mutation von *IBM1* beruht, wurde die transkribierte Sequenz des 6,7 kb langen Gens und der angrenzende 5'-Bereich in einen Vektor kloniert. Mit Hilfe des Gateway Vektorsystems von *Invitrogen* wurde die 7,7 kb lange DNA-Sequenz des *IBM1*-Locus vor die codierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) kloniert. Die T-DNA wurde durch die Transformation mit *A. tumefaciens* in das Genom von *+/ibm1-12* Heterozygoten integriert und die Transgen beinhaltenden *ibm1-12* Mutanten in der zweiten Generation nach Transformation analysiert.

Die Folgegenerationen von sechs unabhängigen transgenen Linien wurden phänotypisch analysiert. Durch die wiederhergestellte *IBM1*-Funktion erreichte die Fertilität von komplementierten *ibm1-12* Mutanten das mit dem Wildtyp vergleichbare Niveau (Abbildung 3.8 B). Ebenso konnte das frühzeitige Terminieren des Sprossapikalmeristems komplementiert werden. Auch Veränderungen des Blühzeitpunkts in den moderat spätblühenden *ibm1-12* Mutanten und die Rosettenblattform, -struktur und -farbe werden komplementiert.

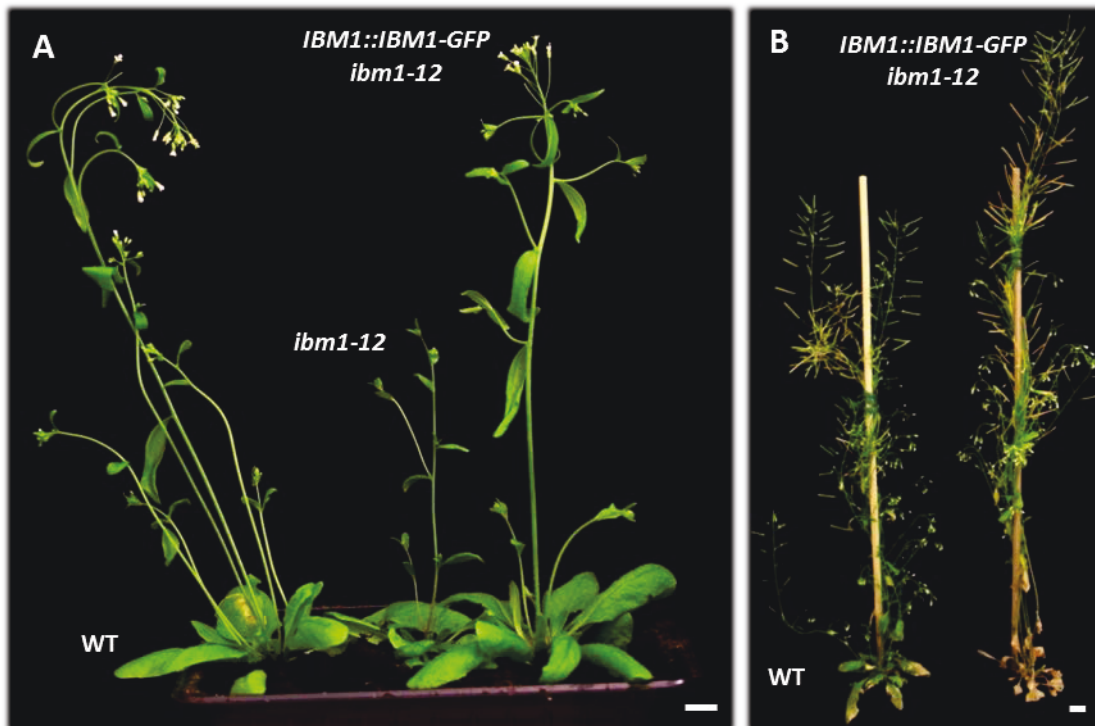


Abbildung 3.8: Komplementation der *ibm1-12* Mutante.

A. Der *ibm1-12* Phänotyp wird durch das Transgen *IBM1::IBM1-GFP* komplementiert. Komplementierte Mutanten entwickeln mit dem Wildtyp vergleichbare Infloreszenzen. Die Entwicklung der Infloreszenz bei der *ibm1-12* Mutante ist verspätet. Die komplementierte Mutante ist zum selben Zeitpunkt beim vergleichbaren Entwicklungsstadium wie der Wildtyp. **B.** Die Fertilität wird durch das Transgen *IBM1::IBM1-GFP* in *ibm1-12* Mutanten wiederhergestellt.

Neben den zahlreichen Phänotypmerkmalen von *ibm1-12* Mutanten konnte das Transgen *IBM1::IBM1-GFP* auch den Infloreszenzphänotyp komplementieren (Abbildung 3.8 A). Sekundäre Infloreszenzen ohne unterstehendes Hochblatt sind in wenigen Individuen und nur an den ersten Nodien, vergleichbar mit dem Wildtyp, zu beobachten (Abbildung 3.4). Der Anteil von transformierten FM ist in den komplementierten Individuen deutlich geringer, als bei *ibm1-12* Mutanten (Abbildung 3.5).

Die beschriebenen phänotypischen Analysen schließen einen möglichen artifiziellen Effekt bei der Generierung von T-DNA Insertionslinien von *IBM1* aus. Daher beruhen die Entwicklungsdefekte der floralen Meristemidentität bei *ibm1-12* Mutanten auf dem Funktionsverlust von *IBM1*. Im Umkehrschluss ist damit gezeigt, dass *IBM1* die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität reguliert und somit für den Reproduktionserfolg in *A. thaliana* essentiell ist.

3.1.7. Einfluss der enzymatischen Aktivität der JmjC Domäne von IBM1 auf die Regulation der Meristemidentität

Die Komplementation der *ibm1-12* Mutante mit *IBM1::IBM1-GFP* hat bestätigt, dass die Expression von *IBM1* für die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität in *A. thaliana* notwendig ist. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die *IBM1* vermittelte Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität durch die enzymatische Funktion der JmjC Domäne von *IBM1* reguliert wird.

Die JmjC Domäne benötigt für die Histon-Demethylase-Aktivität die Kofaktoren Fe(II) und α -Ketoglutarat (Elkins, J. M. et al. 2003). Um die Rolle der enzymatischen Aktivität von *IBM1* in der Meristemregulation zu untersuchen, wurde eine Aminosäure im katalytischen Zentrum der JmjC Domäne ausgetauscht, H679Y. Dieses Histidin ist speziessübergreifend konserviert in der JmjC Domäne *IBM1*-orthologer Proteine und entspricht dem H1120 des orthologen humanen Proteins JHDM2A, welches Fe(II) bindet (Abbildung 3.9). Ohne die Fe(II)-Bindung der JmjC Domäne ist deren enzymatische Funktion stark beeinträchtigt. Dies wurde für das humane Ortholog JHDM2A durch die eingeführte Mutation H1120Y gezeigt (Yamane, K. et al. 2006).

hsJHDM2A	1058	MPSRFDDLMANIPLEPYTR-RDGKLNLASRLPNYFVRPDLGPKMYNAYGLITPEDRKYGT	1116
		+P ++ + ++PL YT +G LNLA +LP ++PD+GPK Y A G R	
IBM1	616	LPRHAEFLCSLPLKHYTHPVNGPLNLAVKLPQNCLKPDMGPKTYVASGFAQELGRGDSV	675
		# * *	
hsJHDM2A	1117	TNLHLDVSDAANVMVYV-----GIPKGQCEQEEVLKTIQDGDSELTIKRFIEGKE	1168
		T LH D+SDA N++ ++ GI + + E+ LK + +++ + +E	
IBM1	676	TKLHCDMSDAVNILTHISEVPMQPGIGNLKKKHAEQDLKELYSSVANKEEMMEILENSR	735
		H679Y	
hsJHDM2A	1169	KP-----GALWHIYAAKDTEKIREFLKKVSEE--QGQENPADH--DPIHDQSWYLDR	1216
		+ GALW I+ +D K+ +++K +E P PIHDQ++YL R	
IBM1	736	QQVQNVETDDGALWDIFRREDIPKLESYIEKHHKEFRHLYCCFVSQVVHPIHDQNFYLTR	795
		*	
hsJHDM2A	1217	SLRKRLHQEYGVQGWAIQVFLGDVVFI PAGAPHQVHNLVYSCIKVAEDFVSPEHVKHCFWL	1276
		+L +EYG++ W Q LGD V IP G PHQV NL SC KVA DFVSPE+V C L	
IBM1	796	YHIMKLKEEYGIPTFTNQLGDAVLIPVGCAPHQVRNLKSCNKVALDFVSPENVSECLRL	855
hsJHDM2A	1277	TQEFR 1281	
		T+++R	
IBM1	856	TKQYR 860	

Abbildung 3.9: Sequenzhomologie der JmjC Domäne von *IBM1* und des Orthologen humanen JHDM2A.

Die Zahlen geben die Aminosäurennummern der jeweiligen Proteine an. Aminosäuren, die in JHDM2A an der Bindung von Fe(II) und α -Ketoglutarat beteiligt sind, sind mit * und # respektive angezeigt. Zur Inaktivierung der JmjC Domäne von *IBM1* wurde die Mutation H679Y eingeführt (rote Markierung).



Abbildung 3.10: Mutation der JmjC-Domäne von IBM1 führt zum *ibm1-12*-Phänotyp.
 A. Die Mutante *ibm1-12* wird durch das Transgen *35S::IBM1(H679Y)* nicht komplementiert.
 B. Das *35S::IBM1* Transgen komplementiert den Infloreszenz- und C. Rosettenblattphänotyp von *ibm1-12* Mutanten. Der Rosettenblattphänotyp wird durch die mutierte JmjC Domäne nicht komplementiert. (Je vier transgene Linien mit zehn Individuen wurden untersucht. Es sind repräsentative Individuen dargestellt.)

Zur Untersuchung der Notwendigkeit einer intakten JmjC Domäne von IBM1 für die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität in *A. thaliana* wurden zwei DNA-Konstrukte kloniert, *35S::IBM* und *35S::IBMlp.m*. Eines enthält die volle Länge der cDNA von *IBM1*, das zweite – die cDNA mit einer Basensubstitution, welche das Basentriplet CAC zu TAC verändert und zur angestrebten H679Y Mutation in der JmjC Domäne führt. Es wurden vier *IBM1*-Überexpressionslinien *35S::IBM1* und vier Linien mit dem Transgen *35S::IBMlp.m* im Hintergrund von hemizygoten *+/ibm1-12* Mutanten isoliert. Zusätzlich wurden vier weitere *IBM1*-Überexpressionslinien mit dem Transgen *35S::IBM1-GFP* isoliert (Kap. 3.2.2). Die transformierten *ibm1-12* Mutanten wurden auf mögliche Komplementation phänotypisch analysiert.

In der Summe konnte die *ibm1-12* Mutante mit fünf von sieben *IBM1*-Überexpressionslinien *35S::IBM* und *35S::IBM1-GFP* komplementiert werden. Einige Linien produzierten eine erhöhte Anzahl an Hochblättern mit Seitentrieben, jedoch entwickelten die komplementierten Mutanten keine florale Reversion und waren fertil (Abbildung 3.10 B). Die Größe, Struktur und Farbe von Rosettenblättern waren in Überexpressionslinien im *ibm1-12* Hintergrund mit dem Wildtyp vergleichbar (Abbildung 3.10 C). Im Gegensatz dazu konnten alle vier von vier isolierten *IBM1*-Überexpressionslinien mit mutierter JmjC Domäne die *ibm1-12* Mutante nicht komplementieren (Abbildung 3.10 A, C). *ibm1-12* Mutanten mit dem beinhaltenden Transgen *35S::IBMlp.m* glichen phänotypisch den *ibm1-12* Mutanten ohne das Transgen. Alle Phänotypmerkmale von *ibm1-12* Mutanten traten mit vergleichbarer Penetranz bei allen vier transgenen Linien auf.

3.2. Untersuchung der spatio-temporalen Expression von *IBM1*

Die Analyse des *ibm1-12* Phänotyps hat ergeben, dass *IBM1* den Übergang zur reproduktiven Entwicklung und die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität reguliert. Dies sind für die Reproduktion von *A. thaliana* essentielle Entwicklungsprozesse, die auf der Differenzierung von meristematischen Stammzellen und der Aufrechterhaltung deren Zellidentität basieren. Um zu analysieren, ob *IBM1* auch in den Organen exprimiert ist, in denen Phänotypen in der *ibm1-12* Mutante zu erkennen sind, wurde die Expression von *IBM1* in unterschiedlichen Organen und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *A. thaliana* untersucht. Zu diesem Zweck wurden mehrere verschiedene Reporterlinien hergestellt und *in vivo* im Wildtyp von *A. thaliana* analysiert.

Bei der einen Herangehensweise wurde untersucht, ob der 5'-Bereich von *IBM1* die benötigten regulatorischen Elemente für das native Expressionsprofil von *IBM1* beinhaltet. Dazu wurde eine 1 kb lange Promotorsequenz von *IBM1* amplifiziert und mit Hilfe Invitrogens Gateway Vectorsystems vor die codierende Sequenz von β -Glucuronidase (GUS) kloniert. Der Wildtyp von *A. thaliana* wurde mit dem Konstrukt transformiert und die Transformanten auf Hygromycin haltenden axenischen Medien selektioniert. Es wurden 15 Transformanten isoliert und davon vier transgene Linien in der zweiten Generation nach Transformation (T2) analysiert, in welchen das Konstrukt, entsprechend dem monohybriden mendelschen Erbgang, drei zu eins segregierte. Die Expressionsmuster in den untersuchten *pIBM1::GUS* Reporter-Linien waren so unterschiedlich, sodass keine verlässlichen Ergebnisse bezüglich des tatsächlichen *IBM1*-Expressionsprofils gewonnen werden konnten.

Mit einer alternativen Herangehensweise wurde die Expression des *IBM1* Proteins untersucht, indem ein zweites GUS-Reporterkonstrukt kloniert wurde, das die transkribierte Sequenz von *IBM1* sowie einen 1 kb langen 5'-Bereich enthielt (*IBM::IBM1-GUS*). Dieses Reporter-Konstrukt war bis auf das Epitop mit der Sequenz des *IBM1::IBM1-GFP* Transgens identisch. Hemizygote *ibm1-12/+* Mutanten wurden mit dem hergestellten DNA-Konstrukt transformiert, die Selektion von Transformanten und die Etablierung transgener Linien erfolgte wie mit *IBM1::IBM1-GFP* (Kap. 3.1.6). Wie *IBM::IBM1-GFP* so konnte auch *IBM::IBM1-GUS* die *ibm1-12* Mutante komplementieren.

Neben der Untersuchung des Gewebes, in dem *IBM1* exprimiert ist, wurde die subzelluläre Lokalisation des *IBM1* Proteins untersucht. Zuerst wurde das *IBM1*-GFP Fusionsprotein mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, das in Kapitel 3.1.6 zur Komplementation der *ibm1-12*

Mutante verwendet wurde. Bei der konfokal-mikroskopischen Untersuchung konnte in keinem des untersuchten Gewebe ein GFP-Signal gefunden werden. Sowohl das verifizierte Leseraster von *IBM1* und *GFP* im DNA-Konstrukt, als auch die erfolgte Expression durch die Komplementation ließen auf alternative Gründe für das fehlende GFP-Signal schließen. Nicht selten, so zeigt die Erfahrung mehrerer Forschungsgruppen, stellt sich der endogene Promotor eines Gens als zu schwach heraus, um ein sichtbares fusioniertes GFP-Protein zu exprimieren. Darüber hinaus kann das Fusionsprotein posttranslationaler Abspaltung des GFP Proteins von *IBM1* unterliegen.

Im anderen Fall wurde ein DNA-Konstrukt kloniert, bei dem ebenfalls GFP als Reporterprotein fungierte. Als Matrize für die Gensequenz von *IBM1* wurde die cDNA des Wildtyps genommen, welche vor die codierende Sequenz von GFP und nach dem doppelten *Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S* Promotor kloniert wurde. Der *35S* Promoter ist ein sehr starker Promoter, der konstitutiv und in den meisten Zellen aktiv ist. Das generierte *35S::IBM1-GFP* Transgen wurde in dieser Arbeit verwendet, um verschiedene Fragestellungen zu beantworten. Zum einen konnte mit diesem Konstrukt die subzelluläre Lokalisation des überexprimierten *IBM1* Proteins untersucht und damit der mögliche Fall eines schwachen *IBM1* Promoters umgangen werden. Zum anderen konnte damit eine mögliche Auswirkung der Überexpression von *IBM1* analysiert und das Verständnis darüber erweitert werden, welche Funktion *IBM1* in *A. thaliana* ausübt.

3.2.1. Expression des *IBM1::IBM1-GUS* Reportertransgens

Die Expression von *IBM1* wurde mit Hilfe des *IBM1::IBM1-GUS* Reporters in unterschiedlichen Organen und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht. Die Expression von *IBM1::IBM1-GUS* wurde in acht transgenen Linien untersucht, die alle ein vergleichbares Expressionsprofil zeigten. In drei von den acht Linien konnte eine Komplementation der *ibm1-12* Mutante beobachtet werden. Vor dem Hintergrund, dass das identische Konstrukt fusioniert mit GFP statt mit GUS in sechs von sechs Fällen eine volle Komplementation der *ibm1-12* Mutante erreichte, liegt die Annahme nahe, dass das längere GUS Protein die Funktion des *IBM1* Proteins beeinträchtigen könnte. Dennoch ist das Expressionsprofil der drei komplementierenden *IBM1::IBM1-GUS* Linien mit dem Expressionsprofil der fünf partiell und nicht komplementierenden Linien vergleichbar.

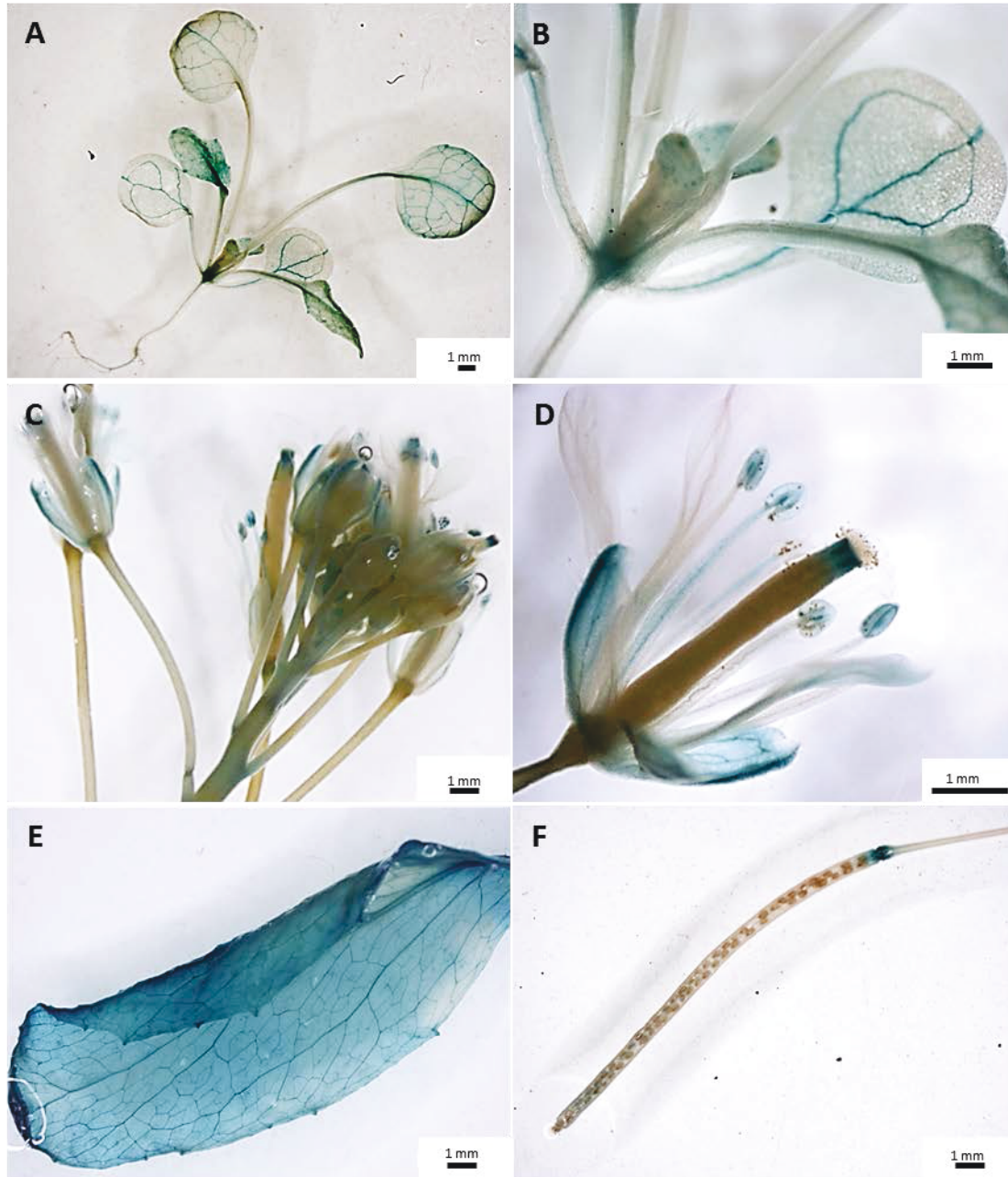


Abbildung 3.11: Expressionsprofil von *IBM1::IBM1-GUS* im Wildtyp.

A. *IBM1-GUS* ist exprimiert in der Vaskulatur der Cotyledonen und Rosettenblätter. **B.** Nahaufnahme der vaskulären Expression von *IBM1::IBM1-GUS*. **C.** Expressionsprofil von *IBM1::IBM1-GUS* in der Infloreszenz. **D.** Expression von *IBM1::IBM1-GUS* in Blütenorganen. Die Expression ist in der Vaskulatur der Sepalen, Antheren, Filamenten und im Stylus zu finden. **E.** *IBM1::IBM1-GUS* ist exprimiert in Hochblättern. Die Expression ist nicht auf die Vaskulatur begrenzt. **F.** Expression von *IBM1::IBM1-GUS* an der Abszissionsstelle einer reifen Schote.

Im vegetativen Stadium ist *IBM1::IBM1-GUS* in den Cotyledonen und in Rosettenblättern exprimiert, wobei die Expression spezifisch auf das vaskuläre Gewebe begrenzt ist (Abbildung 3.11 A, B). Im Gegensatz dazu scheint die Expression in Hochblättern nicht auf die Vaskulatur begrenzt, sondern im gesamten Blattgewebe stattzufinden (Abbildung 3.11 E). In der Inflores-

zenz kann eine selektive Spezifität der *IBM1::IBM1-GUS* Expression auf einzelne Blütenorgane festgestellt werden. *IBM1::IBM1-GUS* ist exprimiert in Sepalen, Antheren, Filamenten und im Stylus, wobei keine Expression in Petalen festzustellen ist (Abbildung 3.11 C, D). Auch in reifen Schoten und deren Samen findet keine *IBM1::IBM1-GUS* Expression statt. Dagegen ist die Expression spezifisch an den Abszissionsstellen der Schoten zu finden (Abbildung 3.11 F).

Die Expressionsanalyse von *IBM1::IBM1-GUS* hat ein Expressionsprofil ergeben, das durch Spezifität auf bestimmte Gewebe und Organe gekennzeichnet ist. Diese Spezifität, zusammen mit weiteren Analysen, konnte Hinweise und Aufschluss darüber geben, welcher Regulationsmechanismus bei der *IBM1* vermittelten Transition und Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität zugrunde liegen könnte.

3.2.2. Subzelluläre Lokalisation des IBM1 Proteins

IBM1 ist ein Protein mit Histon-Demethylase Aktivität (Inagaki, S. et al. 2010). Ergo ist das Zellkompartiment, in dem das Protein mit dieser Funktion lokalisiert sein sollte, der Zellkern. Um diese Kausalität zu bestätigen, wurde die subzelluläre Lokalisation des IBM1 Proteins durch die Überexpression von translational fusioniertem IBM1 mit dem GFP Protein untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein DNA-Konstrukt kloniert, das das IBM1 Protein C-terminal fusioniert mit GFP überexprimiert. Heterotygoten *+/ibm1-12* (Ws) und *+/ibm1-5* (Col) wurden mit *A. tumefaciens* transformiert, die vorher mit dem klonierten Expressionsvektor transformiert wurden. Es konnten fünf transgene Linien isoliert werden. Vier transgene Linien wurden auf Komplementation überprüft. In drei Linien konnte eine Komplementation des *ibm1-12* Phänotyps festgestellt werden. Unter der Verwendung eines Konfokalmikroskops wurden die Wurzeln der drei komplementierenden transgenen *35S::IBM1-GFP* Linien zur konfokal-mikroskopischen Untersuchung herangezogen. In allen der drei Linien konnten zellkernlokalisierte GFP-Signale in den Wurzelspitzen visualisiert werden (Abbildung 3.12).

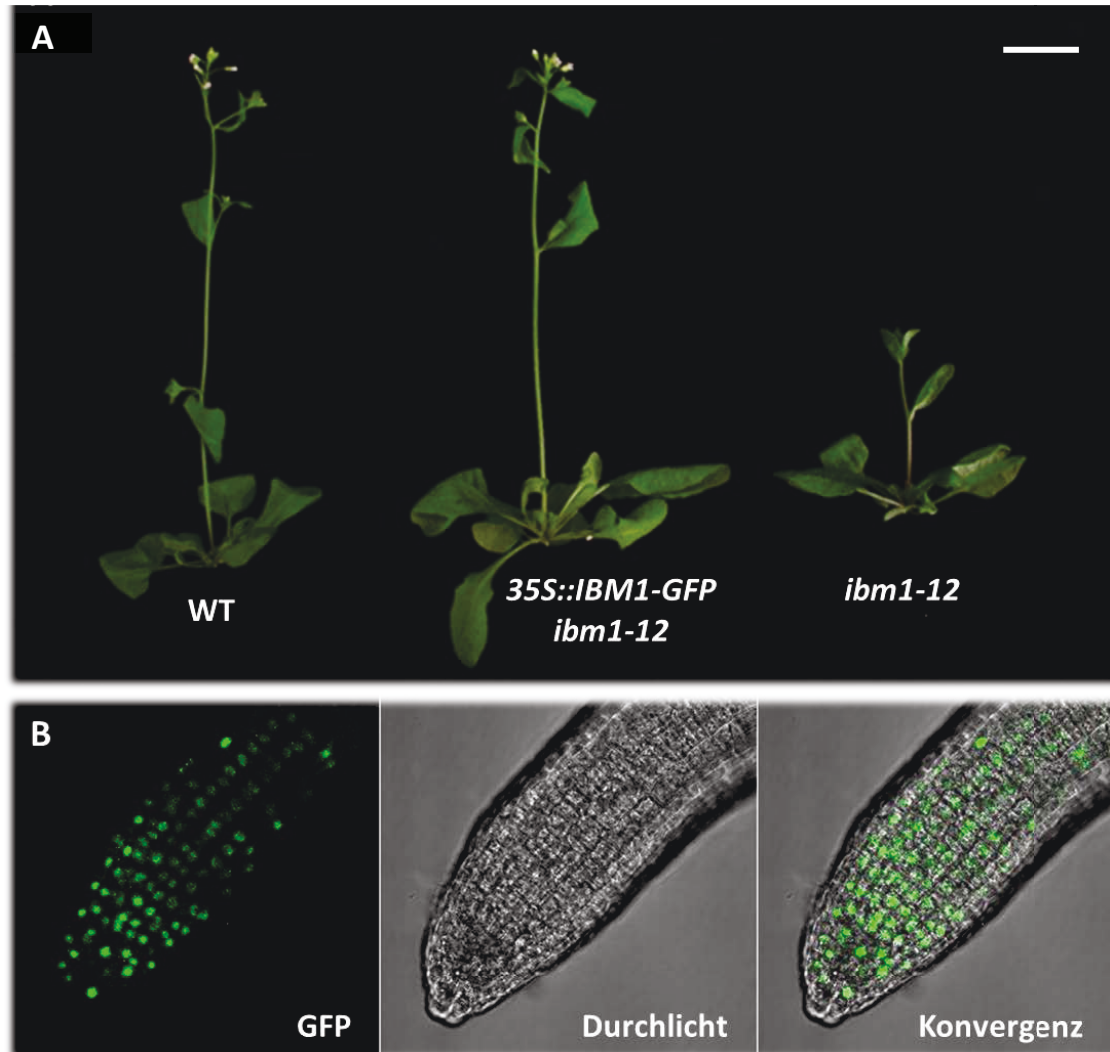


Abbildung 3.12: Subzelluläre Lokalisation von IBM1-GFP.

A. Komplementation der *ibm1-12* Mutante durch das *IBM1* überexprimierende Transgen *35S::IBM1-GFP*. **B.** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der transgenen Überexpressionslinie *35S::IBM1-GFP* im *+/ibm1-5* Hintergrund in der Wurzelspitze von *A. thaliana*. Das IBM1-GFP Fusionsprotein ist lokalisiert im Zellkern.

3.3. Untersuchung von möglichen Zielgenen von *IBM1*

Die Analyse des Phänotyps von *ibm1-12* Mutanten zusammen mit dem Expressionsprofil von *IBM1* können Hinweise darüber geben, welche möglichen Zielgene von *IBM1* reguliert werden. Der pleiotropische Charakter des *ibm1-12* Phänotyps mit seiner Ausprägung in beinahe allen Organen von *A. thaliana* stimmt mit den Resultaten überein, dass eine Vielzahl von Genen verschiedener Genfamilien und aus unterschiedlichen Regulationsmechanismen von *IBM1* reguliert werden (Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Die publizierten Ergebnisse lassen jedoch nicht auf die Zielgene von *IBM1* schließen, die bei der *IBM1*-vermittelten Regulation der Meristemidentität reguliert werden, da die Expressionsanalysen in Keimlingen und im Ökotyp Col durchgeführt wurden. Der Phänotyp von *ibm1-5* Mutanten im Ökotyp Col ist in der ersten homozygoten Generation schwach und wird erst von Generation zu Generation verstärkt. Der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten ist ein Teilaspekt des gesamten Phänotyps der *ibm1-12* Mutante, welcher die Untersuchung der Rolle von *IBM1* bei der Differenzierung und Aufrechterhaltung von Zellidentität ermöglicht. Der Phänotyp lässt darauf schließen, dass das Gewebe, in dem *IBM1* für die Regulation der Meristemidentität benötigt wird, das Sprossapikalmeristem sein könnte.

Der *ibm1-12* Infloreszenzphänotyp besitzt eine Ähnlichkeit mit der *lfy* Mutante (Schultz, E. A. and Haughn, G. W. 1991, Weigel, D. et al. 1992). *LFY* gehört zur Gruppe der floralen Integratoren, welche die Blühinduktion bewirken. Während der reproduktiven Entwicklung reguliert *LFY* die Transition zur Blütenentwicklung durch Aktivierung von *API*. *lfy* Mutanten entwickeln während des ganzen Lebenszyklus keine Blüten, sondern nur Seitentriebe mit vegetativen Strukturen. Florale Reversion tritt bei *lfy* Mutanten nicht auf, da das Sprossapikalmeristem die florale Identität nicht erreicht. Bedingt durch den fehlenden Übergang zur Blütenentwicklung entwickeln *lfy* Mutanten eine erhöhte Anzahl an Hochblättern mit Seitentrieben, wie dies auch bei *ibm1-12* Mutanten zu beobachten ist.

Diese Befunde auf der Basis der Phänotypanalyse lassen die Hypothese aufkommen, dass die Gene, die die florale Meristemidentität determinieren, von *IBM1* transkriptionell reguliert werden. Mit drei Herangehensweisen wurde untersucht, welche Kandidatengene in *ibm1-12* Mutanten reprimiert sind. Mit einem Oligonukleotid-Microarray der cDNA von *ibm1-12* Mutanten und dem Wildtyp sollte genomweit ein Überblick verschafft werden, welche Gene in Infloreszenzen durch *IBM1* reguliert werden. Beim Ernten von Gewebe wurden die primären Infloreszenzen von acht Wochen alten Pflanzen unter Langtag-Bedingungen abgeschnitten und alle offenen und geschlossenen Blüten entfernt, sodass das SAM inklusive der Blütenanlagen ange-

reichert wurde. Mit anschließender Analyse der Expression von Kandidatengenomen mittels quantitativer RT-PCR sollte deren Regulation von *IBM1* bestätigt werden. Abschließend wurden Reporterkonstrukte der potenziellen Zielgene von *IBM1* generiert und in *ibm1* eingebracht, um deren Regulation spatiotemporal und *in vivo* zu untersuchen.

3.3.1. Genomweite Untersuchung der Genexpression in *ibm1*

Der Oligonukleotid-Microarray mit einem Filter für zweifachen Expressionsunterschied zwischen Wildtyp und Mutante ergab 1477 Gene, die in Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten reprimiert und 2188 Gene, die misexprimiert sind (Abbildung 3.13, Kap. 5.2). Unter den am stärksten reprimierten Genen befinden sich zwei Genfamilien, Oleasine (*GRP16*, *GRP17*, *GRP19*, *GRP20*) und Lipasen (*EXL4*, *EXL6*), deren Proteine Bestandteile der extrazellulären Matrix des Pollens sind (Mayfield, J. A. et al. 2001). Der Locus *SUPERMAN* (*SUP*) wird durch CHG-Methylierung durch die Histon-Methyltransferase *KYP* und DNA-Methyltransferase *CMT3* reguliert und ist in *ibm1-12* Mutanten reprimiert (Jackson, J. P. et al. 2002) (Abbildung 3.14). Von den in *ibm1-12* Mutanten reprimierten Genen, die die florale Meristemidentität regulieren, ist *FT* am stärksten reprimiert. Die Expression von weiteren floralen Integratoren, *SOC1* und *LFY*, ist beim gewählten Filter unverändert. Die nachgeschalteten Gene von *FT*, *API* und *CAL*, die für die Initiierung des floralen Meristems benötigt werden, sind ebenfalls reprimiert, wobei die Expression des *API*-Homologen *FUL*, die für die Regulation der floralen Meristemidentität notwendig ist, unverändert ist. Weiterhin ist eine Gruppe von MADS-Box Transkriptionsfaktoren in *ibm1-12* Mutanten reprimiert (*AP3*, *PI*, *AG*, *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*), die für die Entwicklung von Blütenorganen aller vier Wirtel benötigt werden (Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M. 1991, Theissen, G. and Melzer, R. 2007).

3.3.2. Untersuchung der Expression von Meristemidentitätsgenen in *ibm1*

Nach dem genomweiten Überblick durch den Oligonukleotid-Microarray über die in Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten reprimierten Gene wurde eine begrenzte Anzahl an Kandidatengenomen ausgewählt, die möglichen Zielgenen von *IBM1* bei der Regulation der Meristemidentität entsprechen könnten. Darunter sind die floralen Integratoren *SOC1*, *LFY* und *FT*, die die Blühinduktion bewirken. *SOC1* und *LFY* sind im Meristem exprimiert. Das mobile Protein codierende *FT* wird in den Geleitzellen des Phloems der Rosettenblätter exprimiert und zum Meristem transportiert, wo es im Proteinkomplex mit FD die Blühinduktion bewirkt (Mathieu, J. et al. 2007). Andere Expressionsstudien zu *FT* und diese Arbeit zeigen, dass *FT* auch in Hochblättern,

3. Ergebnisse

-fache Expression		<i>A. thaliana</i> Gennummer	Genname	-fache Expression		<i>A. thaliana</i> Gennummer	Genname
799,6	-	AT5G07530	GRP17	107,5	+	CB253682	-
383,6	-	AT5G07550	GRP19	86,1	+	AT1G44130	AT1G44130
345,6	-	AT2G06002	AT2G06002	78,2	+	AT4G25200	-
280,7	-	AT1G75940	ATA27	69,4	+	AT5G07610	AT5G07610
185,7	-	AT5G07560	GRP20	69,3	+	AT4G27670	HSP21
168,5	-	AT1G06260	AT1G06260	65,2	+	AT4G22513	AT4G22513
129,1	-	AT1G68875	AT1G68875	64,2	+	AT2G05440	AT2G05440
109,4	-	AT1G20130	AT1G20130	55,2	+	AT2G29350	SAG13
98,2	-	AT1G75910	EXL4	55,2	+	AT1G17180	ATGSTU25
96,6	-	AT1G74550	CYP98A9	49,9	+	AT1G53540	AT1G53540
93,0	-	AT1G75930	EXL6	49,4	+	AT5G24660	AT5G24660
83,1	-	AT2G46880	ATPAP14	45,5	+	AT3G26470	AT3G26470
82,3	-	AT5G55690	AT5G55690	44,7	+	AT4G17660	AT4G17660
75,4	-	AT1G74540	CYP98A8	41,5	+	AT5G35660	AT5G35660
71,7	-	AT1G07340	ATSTP2	41,1	+	AT4G22517	AT4G22517
71,2	-	AT1G01280	CYP703	40,5	+	AT4G23260	AT4G23260
62,6	-	AT4G36350	ATPAP25	38,6	+	AT5G53230	AT5G53230
59,6	-	AT1G06280	LBD2	35,7	+	AT3G50770	AT3G50770
59,5	-	AT3G23770	AT3G23770	34,7	+	AT3G10440	AT3G10440
56,9	-	AT1G61110	ANAC025	34,2	+	AT2G25470	AT2G25470
55,1	-	AT1G20132	AT1G20132	33,9	+	AT5G11110	ATSPS2F/SPS1
54,0	-	AT2G18420	AT2G18420	33,9	+	AT3G59220	PRN
51,4	-	AT3G22640	AT3G22640	32,3	+	AT1G66920	AT1G66920
49,0	-	AT3G51590	LTP12	32,1	+	BX838823	-
46,5	-	AT1G26720	AT1G26720	30,1	+	AT4G23210	CRK13/HIG1
45,5	-	AT3G11980	MS2	29,7	+	AT5G33898	AT5G33898
43,8	-	AT5G07540	GRP16	29,7	+	AT3G53040	AT3G53040
43,5	-	AT2G36190	ATCWINV4	28,7	+	AT1G63200	AT1G63200
42,8	-	AT3G25050	XTH3	27,8	+	AT3G57260	BGL2
40,3	-	AT4G12920	AT4G12920	27,7	+	EG436514	-
39,8	-	AT1G56360	ATPAP6	27,4	+	AT5G45840	AT5G45840
36,2	-	AT2G42940	AT2G42940	27,2	+	AT4G39950	CYP79B2
36,0	-	AT5G43340	PHT6	25,8	+	AT3G57240	BG3
34,7	-	AT2G03850	AT2G03850	24,5	+	AT3G45960	ATEXLA3
34,4	-	AT3G07610	IBM1	24,2	+	AT4G23280	AT4G23280
33,9	-	AT5G17340	AT5G17340	24,1	+	AT1G29715	AT1G29715
33,7	-	TA53001_3702	-	23,8	+	AT5G64110	AT5G64110
31,9	-	AT1G13150	CYP86C4	23,8	+	AT1G73810	AT1G73810
31,6	-	AT1G44224	AT1G44224	23,1	+	TA45941_3702	-
31,5	-	TA29941_3702	-	23,1	+	TA52911_3702	-
31,5	-	AT1G15460	ATBOR4	22,6	+	AT1G68290	ENDO 2
28,4	-	AT1G67990	AT1G67990	22,4	+	AT4G11490	AT4G11490
28,3	-	AT1G23570	AT1G23570	22,2	+	AT1G31390	AT1G31390
28,0	-	AT1G78440,1	ATGA2OX1	21,8	+	AT5G55490	ATGEX1
27,8	-	AT1G65480,1	FT	21,2	+	AT3G17520	AT3G17520
27,3	-	AT2G23800,1	GGPS2	21,1	+	AT1G09090	ATRBOHB
27,0	-	AT4G09960,1	STK	20,7	+	AT1G29860	WRKY71
26,8	-	AT1G08065,1	AT1G08065	20,2	+	AT1G54980	AT1G54980
26,4	-	AT4G33355,2	AT4G33355	20,1	+	EG518275	AT1G34315
24,6	-	AT5G49070,1	AT5G49070	20,1	+	AT2G39410	AT2G39410

Abbildung 3.13: Oligonukleotid-Microarray von *ibm1-12* Mutanten.

Es sind jeweils die 50 am stärksten regulierten Gene in den Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten aufgelistet. Rote Tabellenhälfte beinhaltet in *ibm1-12* runterregulierte Gene, grüne Tabellenhälfte – hochregulierte Gene. Der Expressionsarray von *ibm1-12* und Wildtyp Infloreszenzen ergab 1477 Gene, die in *ibm1-12* Mutanten mindestens um Faktor zwei reprimiert und 2188 Gene, die mindestens um denselben Faktor hochreguliert sind. Vollständige Liste s. Anhang 5.2.

Sepalen und Blütenstielen exprimiert ist (Adrian, J. et al. 2010). Der Microarray von Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten hat eine starke Repression von *FT* in *ibm1-12* Mutanten ergeben. Weitere Studien zu *FT*, die zeigen, dass *ft* Mutanten florale Reversion entwickeln (Diplomarbeit Maurice Wernado, 2008), implizieren, dass die Regulation von *FT* bei der *IBM1* vermittelten Regulation der floralen Meristem identität eine zentrale Rolle spielen könnte. Vor diesem Hintergrund wurde die Expression von *FT* in unterschiedlichen Geweben von *ibm1* Mutanten untersucht. Als weiteres mögliches Zielgen von *IBM1* wurde *API* gewählt, das die Initiation floraler Meristeme reguliert. Diese Arbeit hat gezeigt, dass die *cal* Mutation den Infloreszenzphänotyp von *ibm1* verstärkt, wobei *CAL* ein Homolog von *API* ist. Insofern lag die Vermutung nahe,

-fache Expression	in <i>ibm1</i>	<i>A. thaliana</i> -Gennummer	Genname	Protein
34,4	↓	AT3G07610	<i>IBM1</i>	INCREASE IN BONSAI METHYLATION 1
27,8	↓	AT1G65480	<i>FT</i>	FLOWERING LOCUS T; florigen
8,8	↓	AT3G23130	<i>SUP</i>	SUPERMAN; transcription factor/ zinc ion binding
5,4	↓	AT1G24260	<i>SEP3</i>	SEPALLATA 3; MADS-box transcription factor
4,6	↓	AT1G69120	<i>AP1</i>	APETALA 1; MADS-box transcription factor
4,0	↓	AT3G02310	<i>SEP2</i>	SEPALLATA 2; MADS-box transcription factor
3,9	↓	AT5G15800	<i>SEP1</i>	SEPALLATA 1; MADS-box transcription factor
3,9	↓	AT5G20240	<i>PI</i>	PISTILLATA; MADS-box transcription factor
3,7	↓	AT4G18960	<i>AG</i>	AGAMOUS; MADS-box transcription factor
3,4	↓	AT3G54340	<i>AP3</i>	APETALA 3; MADS-box transcription factor
3,2	↓	AT1G26310	<i>CAL</i>	CAULIFLOWER; MADS-box transcription factor
<2	-	AT2G45660	<i>SOC1</i>	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1
<2	-	AT4G24540	<i>AGL24</i>	AGAMOUS-LIKE 24; MADS-box transcr. factor
<2	-	AT5G10140	<i>FLC</i>	FLOWERING LOCUS C; MADS-box transcr. factor
<2	-	AT5G61850	<i>LFY</i>	LEAFY; transcription factor
<2	-	AT5G60910	<i>FUL</i>	FRUITFULL; MADS-box transcription factor
<2	-	AT2G22540	<i>SVP</i>	SHORT VEGETATIVE PHASE

Abbildung 3.14: Ausgewählte in *ibm1-12* Mutanten runterregulierte Gene aus dem Microarray.

Ein Auszug aus dem Microarray von in *ibm1-12* Infloreszenzen runterregulierten Genen, die im Zusammenhang mit dem Phänotyp und/oder der direkten Regulation durch *IBM1* stehen könnten. Das Florigen *FT* und MADS-box Transkriptionsfaktoren sind reprimiert in Infloreszenzen von *ibm1-12*.

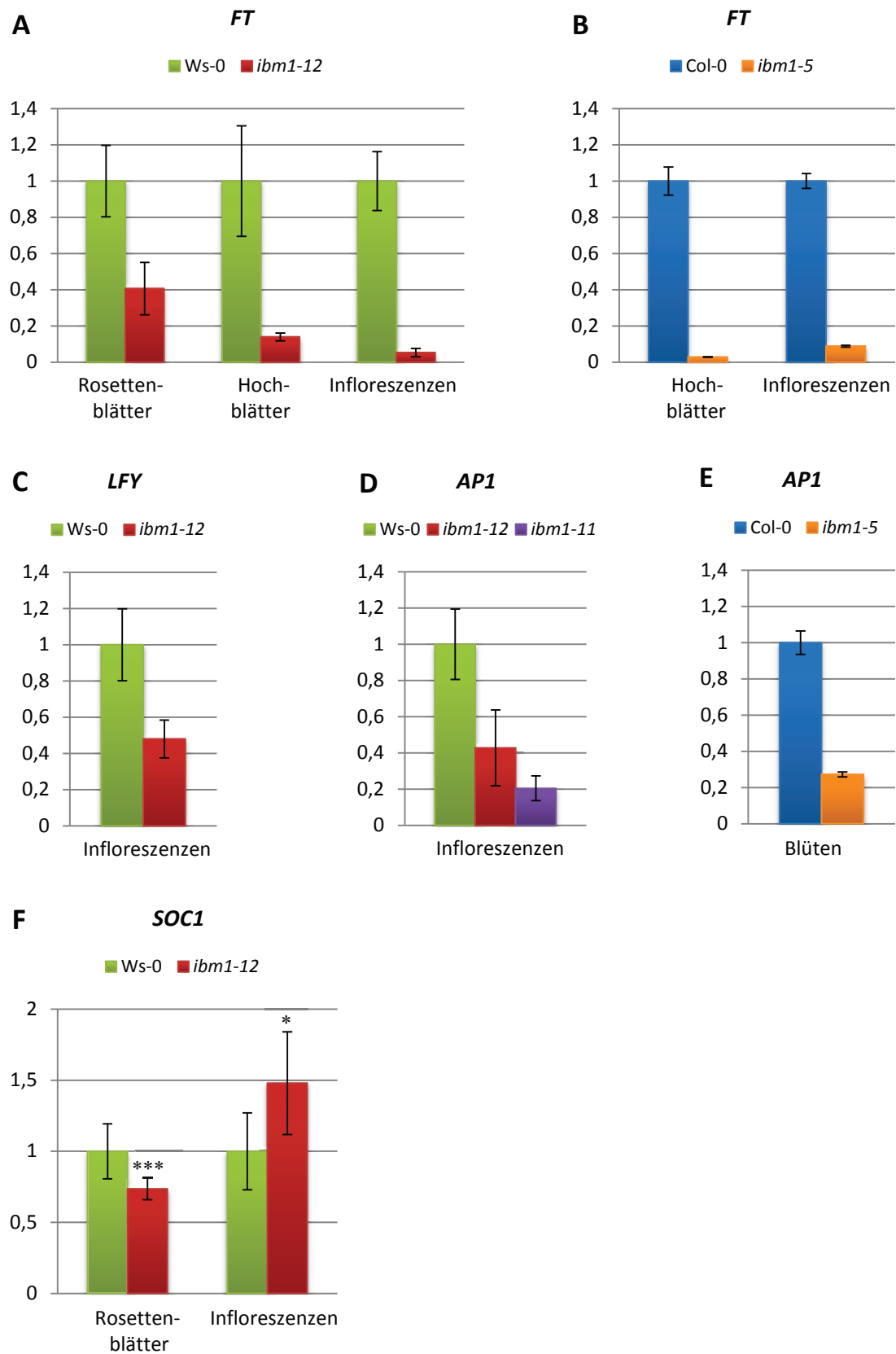


Abbildung 3.15: Expression von Meristemidentitätsgenen in *ibm1* Mutanten.

Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der Expression möglicher Zielgene von *IBM1*. Die Expressionsberechnungen basieren auf mindestens zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben Standardfehler an. Die Expression jedes Gens ist normalisiert auf das Haushaltsgen *eIF4a* und den Wildtyp. Die Expression wurde in verschiedenen Gewebe untersucht. Infloreszenzen wurden geerntet, indem alle offenen Blüten entfernt wurden und die verbliebenen Blüten und Blütenanlagen sowie SAM angereichert. Rosettenblätter wurden vor Blühinduktion geerntet. Zur Untersuchung der Expression von *API* in Blüten wurden offene Blüten des *ibm1-5* Allels geerntet. **A.** Expression von *FT* in verschiedenen Gewebe von *ibm1-12* Mutanten (Ws). Expression ist moderat reduziert in Rosettenblättern, in Hochblättern und Infloreszenzen – stark. **B.** Expression von *FT* in Hochblättern und Infloreszenzen von *ibm1-5* Mutanten (Col). Starke Repression in beiden Gewebe. **C.** Expression von *LFY* in Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten. Moderate Reduktion. **D.** Expression von *API* in *ibm1-12* und *ibm1-11* Mutanten. *API* ist in beiden Allelen reprimiert. **E.** Expression von *API* in offenen Blüten von *ibm1-5* Mutanten. *API* ist reprimiert in Blüten von *ibm1-5*. **F.** Expression von *SOC1* in Rosettenblättern und Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten. Moderate, aber signifikante ($p < 0,001$) Reduktion von *SOC1* in Rosettenblättern von *ibm1-12*. Moderate und knapp signifikante ($0,01 < p < 0,05$) Misexpression von *SOC1* in Infloreszenzen von *ibm1-12*.

dass *API*, zum einen, wegen seiner Redundanz zu *CAL* ein mögliches Zielgen von *IBM1* ist, zum anderen, wird *API* im Meristem vom Proteinkomplex aus FT und FD aktiviert. Zudem ergab der Microarray eine starke Repression von *FT* sowie eine moderate Repression von *API*.

Im Folgenden wurde mittels quantitativer RT-PCR eine ausgewählte Anzahl Genen, die bei der Initiierung und Spezifizierung der floralen Meristemidentität benötigt werden, auf deren Expression in verschiedenen *ibm1* Allelen untersucht. Weil für die RNA Isolierung nicht ausschließlich Zellen des Meristems isoliert werden konnten, wurde diese Gewebe angereichert, indem Infloreszenzen abgeschnitten und alle offenen Blüten entfernt wurden. Demnach entsprach das untersuchte Gewebe Infloreszenzen mit jungen, geschlossenen Blüten und Blütenprimordien, und enthielt auch das Sprossapikalmeristem.

Die Expressionsanalyse mit der quantitativen RT-PCR bestätigte das Ergebnis des Microarrays (Abbildung 3.15). Die im Microarray angezeigte starke Repression von *FT* in Infloreszenzen von *ibm1-12* Mutanten konnte mit der quantitativen RT-PCR verifiziert werden. Die Expression von *FT* in Infloreszenzen von *ibm1-12* (Ws) und *ibm1-5* (Col) Mutanten ist sehr gering (Abbildung 3.15 A, B). In Rosettenblättern von *ibm1-12* Mutanten ist die Expression von *FT* um das zweieinhalbfache der Expression im Wildtyp reduziert. In Hochblättern von *ibm1-12* und *ibm1-5* ist die Repression von *FT* wiederum vergleichsweise stark. In den Infloreszenzen von *ibm1-11* (Ws) und *ibm1-5* (Col) Mutanten ist die Expression von *API* um vier- bis fünffach reduziert (Abbildung 3.15 D, E). Im gleichen Gewebe von *ibm1-12* Mutanten ist die Expression von *LFY* zweifach reduziert (Abbildung 3.15 C). Im Vergleich zu *LFY* und *API*, die nicht nur die Blühinduktion, sondern die Initiierung floraler Meristeme bewirken, ist *SOC1* für die tageslängenabhängige Blühinduktion verantwortlich und ist zu *LFY* und *API* epistatisch. *SOC1* ist in

Rosettenblättern von *ibm1-12* Mutanten leicht reprimiert und in Infloreszenzen leicht erhöht (Abbildung 3.15 F).

3.3.3. Analyse der *FT* Promotoraktivität in *ibm1* durch Fusion mit β -Glucuronidase

Die Untersuchung der Expression von Meristemidentitätsgenen hat gezeigt, dass *FT* möglicherweise entwicklungspezifisch und nur in bestimmten Geweben von IBM1 reguliert sein könnte. Um die Ergebnisse der RT-PCR mit einer zweiten Methode zu verifizieren und die Expression von *FT* spatio-temporal zu untersuchen, wurde mit Hilfe von DNA-Reporterkonstrukten die Aktivität des *FT* Promotors in *ibm1* Mutanten *in vivo* untersucht. Das DNA-Konstrukt *pFT::GUS* ist eine Promotorfusion des 8,1 kb langen *FT*-Promotors mit der codierenden Sequenz des Reporterproteins β -Glucuronidase (GUS) (Adrian, J. et al. 2010). Das Konstrukt wurde durch Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* in das Genom von Wildtyp (Ws) integriert und in hemizygote *+ibm1-12* eingekreuzt. Es wurden zehn Individuen pro Genotyp analysiert. Vor der Tatsache, dass heterozygote *+ibm1-12* keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp haben, wurden sie als Referenz für die *FT*-Promotoraktivität zu den *ibm1-12* Mutanten genommen. Ein vergleichbares *pFT::GUS* Transgen stand im Wildtyp des Ökotyps Col zur Verfügung (Takada, S. and Goto, K. 2003). Es wurde durch Kreuzung mit *ibm-5* Mutanten in deren Hintergrund reingebracht und die GUS-Aktivität untersucht.

In der vegetativen Phase der Entwicklung von *A. thaliana* ist der *FT*-Promotor im sekundären Leitgewebe von Rosettenblättern aktiv (Abbildung 3.16 A). Das Expressionsmuster ist in *ibm1-12* Mutanten mit der Referenz vergleichbar. In der reproduktiven Phase der Entwicklung ist der *FT*-Promotor auch im Leitgewebe von Hochblättern und Sepalen von offenen Blüten aktiv (Abbildung 3.16 B, C, Abbildung 3.17 A, E, J). In Hochblättern von *ibm1-12* (Ws) und *ibm1-5* (Col) Mutanten ist die Expression von *pFT::GUS* schwächer, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der quantitativen RTPCR ist (Abbildung 3.15 A, B). Die Untersuchung der *FT*-Promotoraktivität in Blüten hat ergeben, dass die Expression in bestimmten Organen zu finden ist. Dies betrifft die Sepalen von offenen Blüten (Abbildung 3.16 C, Abbildung 3.17 A, E) und die Antheren (Abbildung 3.17 A). Sowohl in Blüten von *ibm1-12* als auch *ibm1-5* Mutanten ist *pFT::GUS* in Sepalen aktiv (Abbildung 3.16 C, Abbildung 3.17 C, G). Die *pFT::GUS* Aktivität ist an weiteren Arealen der Infloreszenzen beider Ökotypen zu finden. Im Einklang mit der Lite-

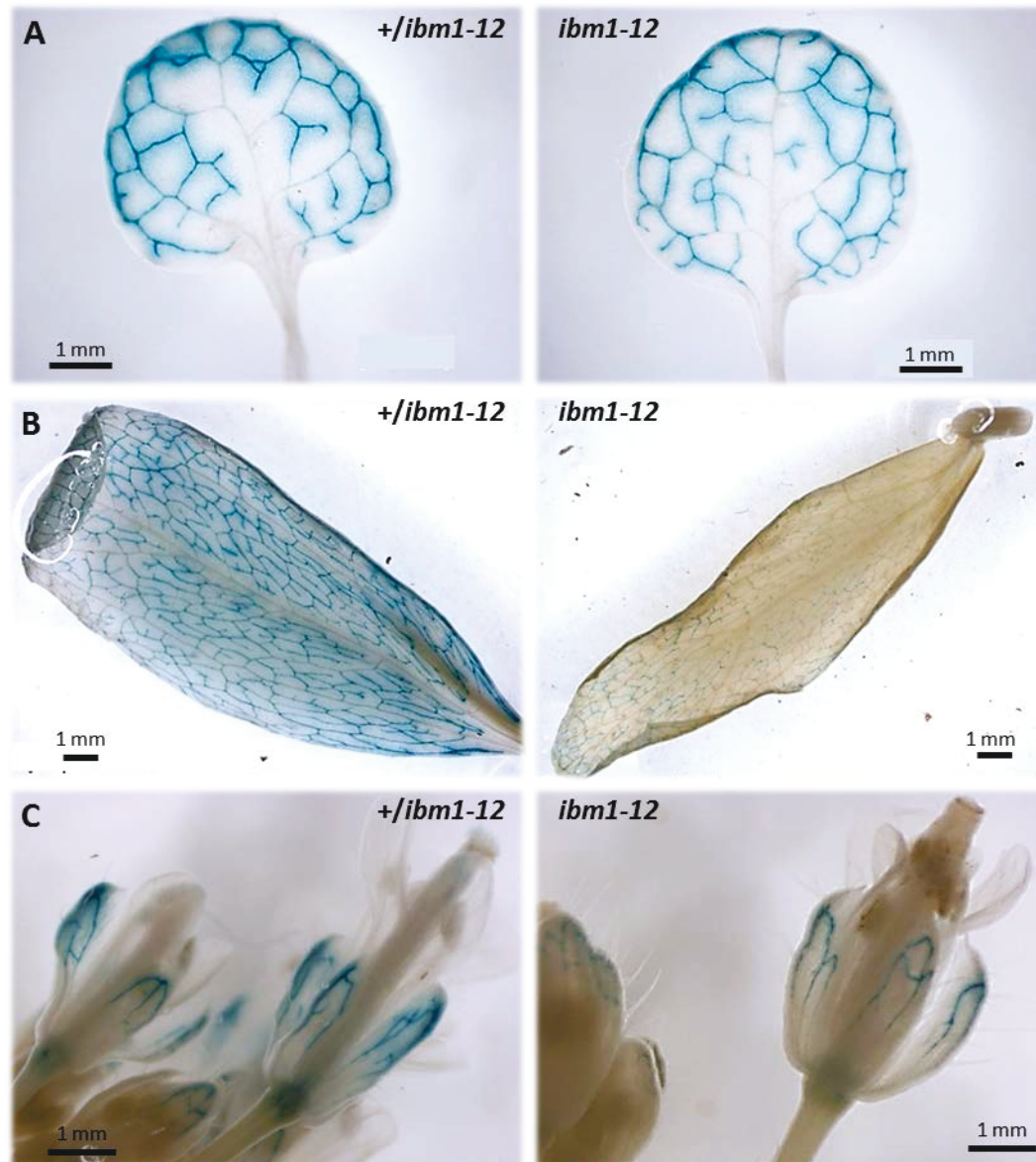


Abbildung 3.16: *FT* Promotoraktivität in *ibm1-12* (Ws) Mutanten.

Es wurde die *FT*-Promotoraktivität durch GUS-Färbung in *ibm1-12* Mutanten und *+/ibm1-12* Hemizygoten untersucht, die das Transgen *pFT::GUS* beinhalten. Letztere dienten als Referenz. **A.** GUS-Färbung von Rosettenblättern zwei Wochen alter transgener Individuen. Die Aktivität des *FT* Promotors ist in der sekundären Vaskulatur der Rosettenblätter lokalisiert. **B.** GUS-Färbung vier Wochen alter Hochblätter transgener Individuen. Die Aktivität des *FT* Promotors ist in der sekundären Vaskulatur der Hochblätter lokalisiert. **C.** GUS-Färbung vier Wochen alter Blüten transgener Individuen. Die Aktivität des *FT* Promotors ist in der Vaskulatur der Sepalen lokalisiert. Die Färbungen erfolgten über Nacht. (n = 10 Individuen/Genotyp.)

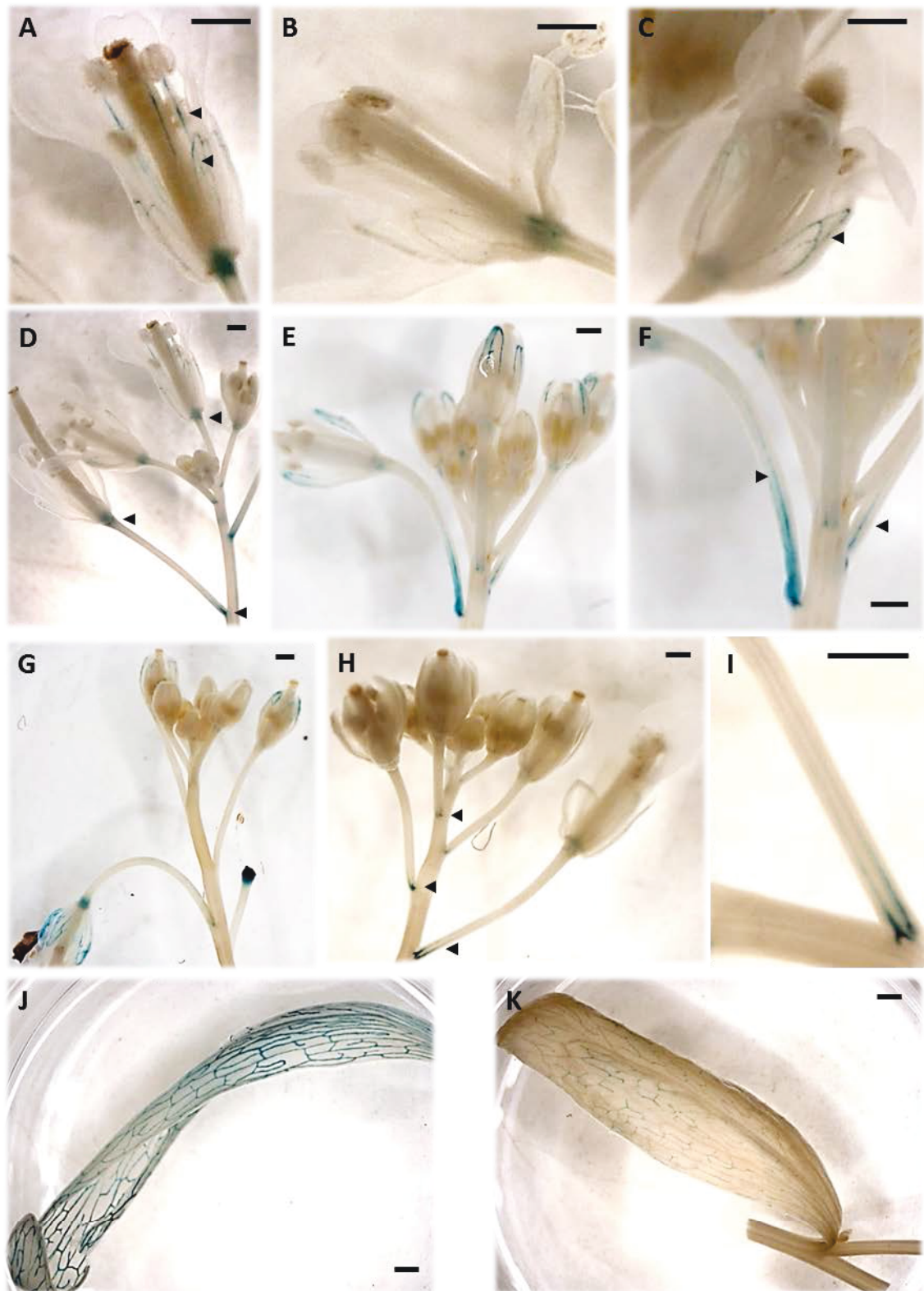


Abbildung 3.17: *FT*-Promotoraktivität in *ibm1-5* (Col) Mutanten.

Es wurde die *FT*-Promotoraktivität durch GUS-Färbung in *ibm1-5* Mutanten und dem korrespondierenden Wildtyp Columbia untersucht, die das Transgen *pFT::GUS* beinhalten. Maßstab ist 1 mm. **A.** Blüte vom Wildtyp. Expression von *pFT::GUS* in der Vaskulatur von Sepalen und in Filamenten. **B.** und **C.** Blüten von *ibm1-5* Mutanten. Expression von *pFT::GUS* in der Vaskulatur von Sepalen. **D.** und **E.** Infloreszenzen vom Wildtyp. Expression von *pFT::GUS* in Sepalen und Blütenstielen. **F.** *FT*-Promotoraktivität in Blütenstielen des Wildtyps (Vergrößerung von E.) und in **I.** *ibm1-5* Mutanten (Vergrößerung von H.) **G.** und **H.** Infloreszenzen von *ibm1-5* Mutanten. Expression von *pFT::GUS* in Sepalen und Blütenstielen. (Artefakt am untersten FM in G.) **J.** Hochblatt des Wildtyps. *FT*-Promotoraktivität in der Vaskulatur. **K.** Hochblatt einer *ibm1-5* Mutante. *FT*-Promotoraktivität ist reduziert.

ratur (Adrian, J. et al. 2010) ist die *FT*-Promotoraktivität in den Blütenstielen zu finden (Abbildung 3.17 D-F), wobei an den jeweiligen beiden Enden der Blütenstielen die Intensität stärker zu sein scheint. Dieses Expressionsmuster ist auch in den *ibm1-5* Mutanten zu finden (Abbildung 3.17 G-I).

3.3.4. Die Rolle von *FT* bei der Regulation der Meristemidentität

Die Analyse der Expression von möglichen Zielgenen von *IBM1* hat eine Repression von *FT* in *ibm1* Mutanten ergeben. Es ist ein Gen, das in *A. thaliana* bei der Integration der floralen Meristemidentität eine zentrale Rolle spielt. In anderen Spezies sind *FT*-Orthologe für die Aufrechterhaltung der Blütenentwicklung verantwortlich (Molinero-Rosales, N. et al. 2004). Demnach galt es herauszufinden, ob der Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten auf die Funktionsunterdrückung von *FT* zurückzuführen ist. Hierbei konnten Hinweise gewonnen werden, indem der Phänotyp von *ft* Mutanten nach den Aspekten des Phänotyps von *ibm1-12* Mutanten untersucht wurde.

Da nur *ibm1* Allele im genetischen Hintergrund des Ökotyps Ws transformierte FM entwickeln, wurde, im Rahmen dieser Arbeit das neue *ft-13* Allel im Ökotyp Ws etabliert und der Phänotyp untersucht. *ft-13* Mutanten entwickeln vergleichbare Infloreszenzdefekte wie *ibm1-12* Mutanten (Abbildung 3.18). Die FM von *ft-13* Mutanten revertieren und produzieren Brakteen. Beim *ft-13* Allel handelt es sich um eine T-DNA Insertionsmutante mit der T-DNA FLAG_107E06 im ersten Intron von *FT*. Die *ft-13* Mutanten wurden von Maurice Wernado in seiner Diplomarbeit charakterisiert (Maurice Wernado, 2008, Diplomarbeit).



Abbildung 3.18: *ft-13* Mutanten mit floraler Reversion.

A. Infloreszenz des Wildtyps. **B.** *ft-13* Mutanten im Ökotyp Ws entwickeln florale Reversion. Rote Pfeile zeigen auf auf Brakteen und transformierte FM. (Maßstab 1 cm.)

Im folgenden Experiment sollte die genetische Interaktion von *IBM1* und *FT* in Doppelmутanten in Bezug auf den Blühzeitpunkt und die Ausprägung der floralen Reversion untersucht werden. Außer dem für hemizygote *ft/+* Mutanten typischen, moderat späteren Blühzeitpunkt haben die *ibm1-11/+ ft-13/+* Mutanten keine weiteren offensichtlichen phänotypischen Aspekte und sind mit den *ft-13/+* Hemizygoten vergleichbar (Abbildung 3.19 B, D).

Die Entwicklung von *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten geht nicht über das vegetative Stadium hinaus (Abbildung 3.19 C). Die Doppelmутanten zeigen die Phänotypmerkmale beider Einzelmутanten. Die Rosettenblätter sind schmal und dunkel wie bei *ibm1-11* Mutanten. Die Anzahl der Rosettenblätter ist bei *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten mit *ft-13* Mutanten vergleichbar (Abbildung 3.19 D), jedoch terminiert das Sprossapikalmeristem im vegetativen Stadium oder kurz nach der Blühinduktion. Wegen der Terminierung des Sprossapikalmeristems konnte die Auswirkung einer vollständigen Funktionsunterdrückung von *FT* in *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten auf die Ausbildung der floralen Reversion nicht untersucht werden.

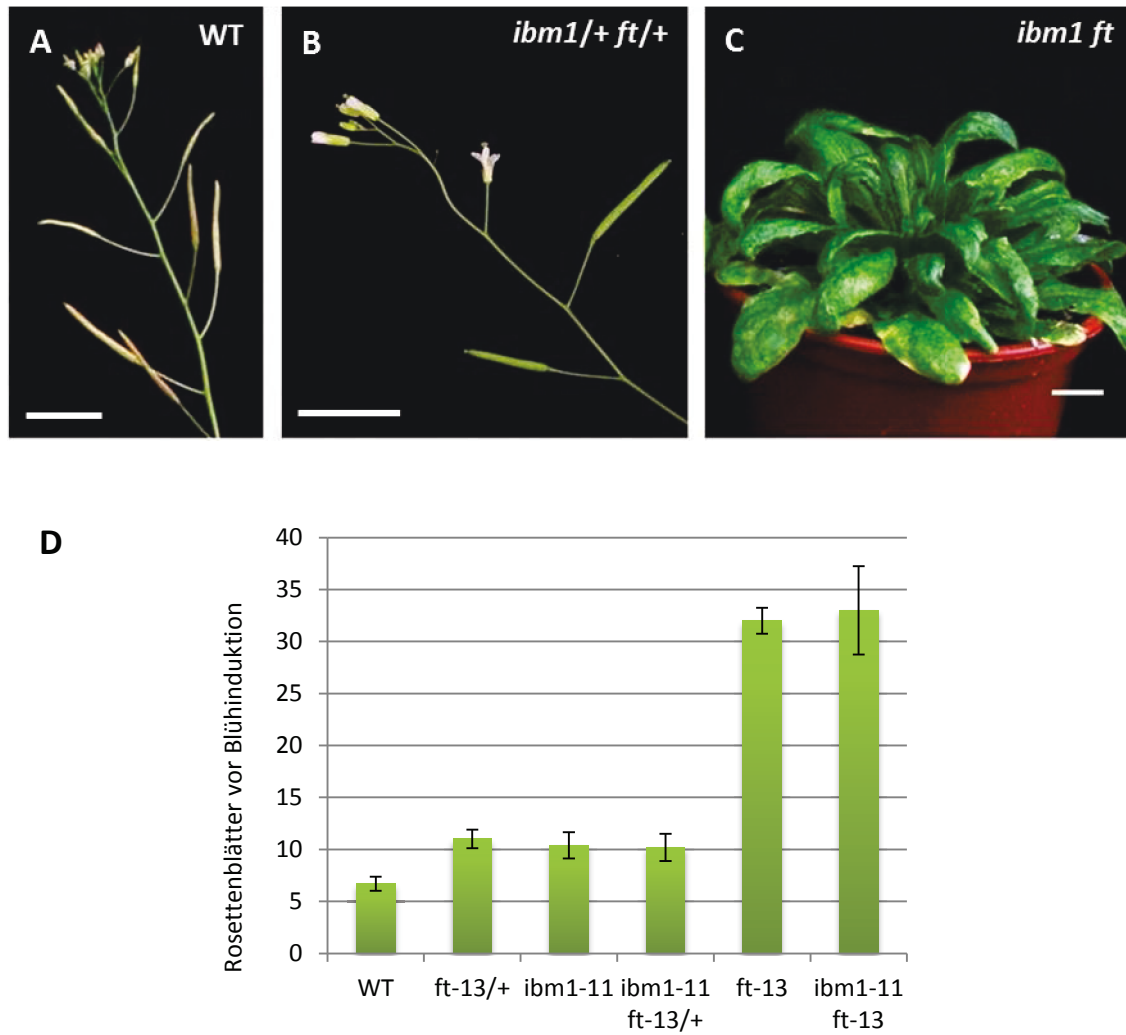


Abbildung 3.19: Kreuzung von *ibm1-11* mit *ft-13*.

A. Infloreszenz vom Wildtyp Ws. **B.** Infloreszenz von *ibm1-11/+ ft-13/+* doppelt hemizygoten Mutanten ohne eines offensichtlichen morphologischen Phänotyps. **C.** Das Sprossapikalmeristem von *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten terminiert im vegetativen Stadium. *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten beenden ihren Lebenszyklus im vegetativen Stadium. **D.** Kein additiver Effekt auf den Blühzeitpunkt zwischen *IBM1* und *FT*. Unter Langtag-Bedingungen blühen hemizygoten *ft-13/+* Mutanten und homozygote *ibm1-11* Mutanten zum selben Zeitpunkt und moderat später als der Wildtyp. Zum selben Zeitpunkt blühen die *ibm1-11 ft-13/+* Mutanten, bei denen es zu keiner Addition des Phänotyps kommt. Die *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten blühen zum selben späten Zeitpunkt wie die *ft-13* Einzelmутanten. (n = 10, Standardabweichung.)

3.4. Epigenetische Regulation von *FT* durch IBM1

IBM1 unterdrückt ektoxische H3K9me2 und DNA-Methylierung des CHG-Typs an hunderterten von Genen (Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Genomweite Studien zur ektoxischen DNA-Methylierung und H3K9me2 in *ibm1* Keimlingen zeigen jedoch keine Veränderung bei *FT* (Deleris, A. et al. 2012, Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *FT* in Infloreszenzen und Hochblättern von *ibm1* Mutanten reprimiert ist, wohingegen die Reduktion in Rosettenblättern moderat ist. Demzufolge sollte die epigenetische Regulation von *FT* durch IBM1 in den Organen untersucht werden, in denen *FT* in *ibm1* Mutanten reprimiert ist.

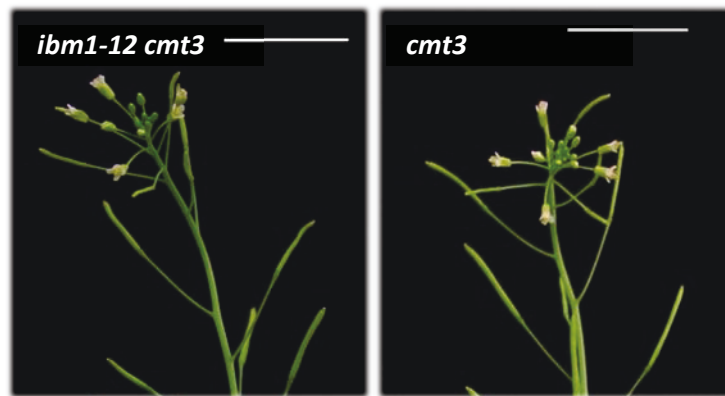
3.4.1. *IBM1* vermittelte und *CMT3*-abhängige Regulation von floraler Meristemidentität und der *FT*-Expression

CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) ist eine DNA-Methyltransferase in *A. thaliana*, die für die DNA-Methylierung des CHG-Typs notwendig ist (Lindroth, A. M. et al. 2001). Die *cmt3* Mutation unterdrückt den Phänotyp von *ibm1* Mutanten im Ökotyp Col, implizierend, dass die ektoxische DNA-Methylierung in *ibm1*-Mutanten, die von *CMT3* etabliert wird, für den Phänotyp verantwortlich ist (Saze, H. et al. 2008a). Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die *IBM1* vermittelte Aufrechterhaltung der Meristemidentität ebenfalls über die Regulation der CHG-Methylierung erfolgt. Um diese mögliche genetische Interaktion zu überprüfen, wurde die *cmt3* Mutation in *ibm1-12* Mutanten eingeführt. Zum einen sollte in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten geprüft werden, ob die *cmt3* Mutation den Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten unterdrückt. Zum anderen sollte durch eine mögliche Wiederherstellung der *FT*-Expression Hinweise gewonnen werden, ob *FT* in *ibm1* Mutanten durch ektoxische DNA-Methylierung des CHG-Typs reguliert wird.

3.4.1.1. Die *cmt3* Mutation unterdrückt den Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten

Zur Erzeugung von *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten wurden T-DNA Insertionslinien FLAG_562B05 isoliert, die eine T-DNA Insertion im ersten Exon von *CMT3* tragen. Für die Studie der genetischen Interaktion von *IBM1* und *CMT3* wurden doppelt homozygote der F3-Generation herangenommen. Die phänotypische Auswertung der *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten wurde unter Langtag-Bedingungen durchgeführt. Die Doppelmutanten befanden sich in der F3 Generation nach der Kreuzung und die mutanten Allele, somit, in der zweiten homozygoten Generation. Die Auswertung hatte gezeigt, dass die Entwicklungsdefekte des Infloreszenz

A



B

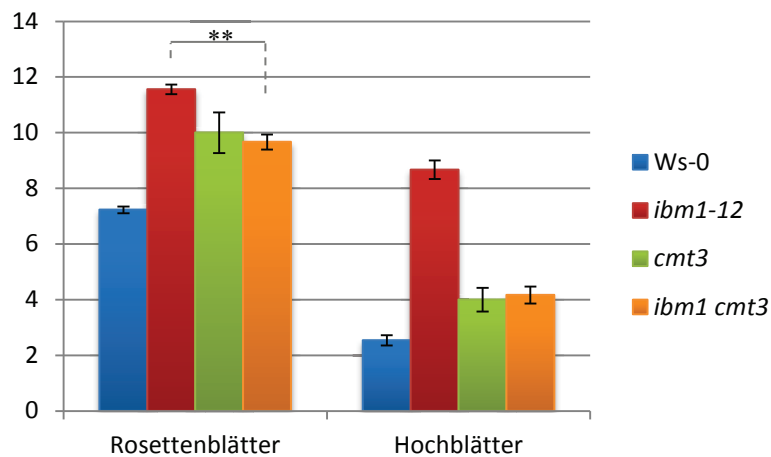


Abbildung 3.20: Die *cmt3* Mutation unterdrückt den Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten.

A. Infloreszenzen acht Wochen alter Mutanten unter Langtag-Bedingungen. *ibm1 cmt3* Doppelmutanten entwickeln normale und fertile Infloreszenzen. Ebenso haben *cmt3* Mutanten keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp. **B.** Die *cmt3* Mutation unterdrückt die Bildung erhöhter Hochblattanzahl in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten ($p < 0,01$). Unter Langtag-Bedingungen sind *cmt3* Mutanten etwas spätblühend, blühen jedoch früher als *ibm1-12* Mutanten. Die *cmt3* Mutation reduziert den Blühzeitpunkt und die Anzahl der Hochblätter bei *ibm1 cmt3* Doppelmutanten auf das Niveau von *cmt3* Einzelmутanten ($n = 10$ Individuen pro Genotyp).

meristems von *ibm1-12* durch die *cmt3* Mutation unterdrückt werden. Die Doppelmutanten entwickeln mit dem Wildtyp vergleichbare, fertile Infloreszenzen, die keine florale Reversion zeigen (Abbildung 3.20 A).

Die Auswertung des Blühzeitpunkts hatte ergeben, dass die *cmt3* Mutanten moderat spätblühend sind, jedoch früher blühen als *ibm1-12* Mutanten (Abbildung 3.20 B). Der Blühzeitpunkt von *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten ist früher als von *ibm1-12* Mutanten und liegt auf dem vergleichbaren Niveau mit den *cmt3* Mutanten. Ebenfalls konnte die *cmt3* Mutation die erhöhte

Anzahl der Hochblätter von *ibm1-12* Mutanten auf das Niveau der *cmt3* Mutanten reduzieren, deren Infloreszenzmeristem ein bis zwei Hochblätter mehr als der Wildtyp produziert.

Die phänotypische Analyse von *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten zeigte, dass sich *cmt3* in Bezug auf den Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten epistatisch zu *ibm1* verhält, was vorher bei *ibm1*-Allelen in Col gezeigt worden wurde. Die *cmt3* Mutation konnte auch die Merkmale des *ibm1-12*-Phänotyps unterdrücken.

3.4.1.2. Analyse der Expression von *FT* in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten

Im Kapitel 3.3 konnte in Infloreszenzen und Hochblättern von *ibm1* Mutanten eine starke *FT*-Repression ermittelt werden. Im Kapitel 3.3.4 konnte gezeigt werden, dass die fehlende Funktion von *FT* zu vergleichbaren Entwicklungsdefekten der Infloreszenz führen kann, wie sie in *ibm1-12* zu finden sind. Durch die Erzeugung von *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten und Analyse des Phänotyps konnte gezeigt werden, dass die *cmt3* Mutation die Entwicklungsdefekte der Infloreszenz von *ibm1-12* Mutanten unterdrücken kann. In der folgenden Expressionsanalyse sollte untersucht werden, ob in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten die Expression von *FT* wiederhergestellt ist, um die Rolle von *FT* bei der *IBM1* vermittelten Regulation der floralen Meristemidentität zu untermauern, und um weitere Aufschlüsse über die potenzielle Rolle von *FT* bei der Regulation der Meristemidentität zu gewinnen.

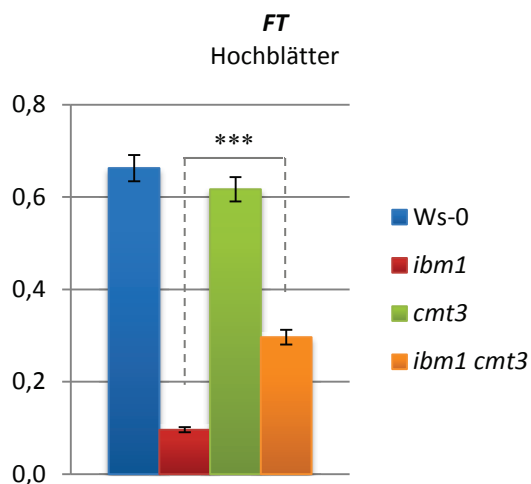


Abbildung 3.21: Die *cmt3* Mutation unterdrückt die *FT*-Repression in *ibm1-12 cmt3* Hochblättern.

Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der Expression von *FT* in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten. In *cmt3* Hochblättern ist *FT* vergleichbar stark exprimiert wie im Wildtyp. In Hochblättern von *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten ist *FT* dreimal höher exprimiert ($p < 0,001$) als in *ibm1-12* Mutanten. Die Repression von *FT* in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten ist partiell unterdrückt. Die Ergebnisse wurden in unabhängigen biologischen Replikaten durch eine andere Person verifiziert. Die Berechnung der Expression basiert auf drei technischen Replikaten und ist normalisiert auf das Haushaltsgen eIF4a.

Für die Expressionsanalyse wurden *ibm1-12*, *cmt3* Mutanten und *ibm1 cmt3* Doppelmutanten mit korrespondierendem Wildtyp unter Langtag-Bedingungen herangezogen. Es wurden vollständig entwickelte Hochblätter von acht Wochen alten Pflanzen für die RNA-Präparation geerntet. Die Expression von *FT* in Hochblättern von *cmt3* Mutanten ist mit dem Wildtyp ver-

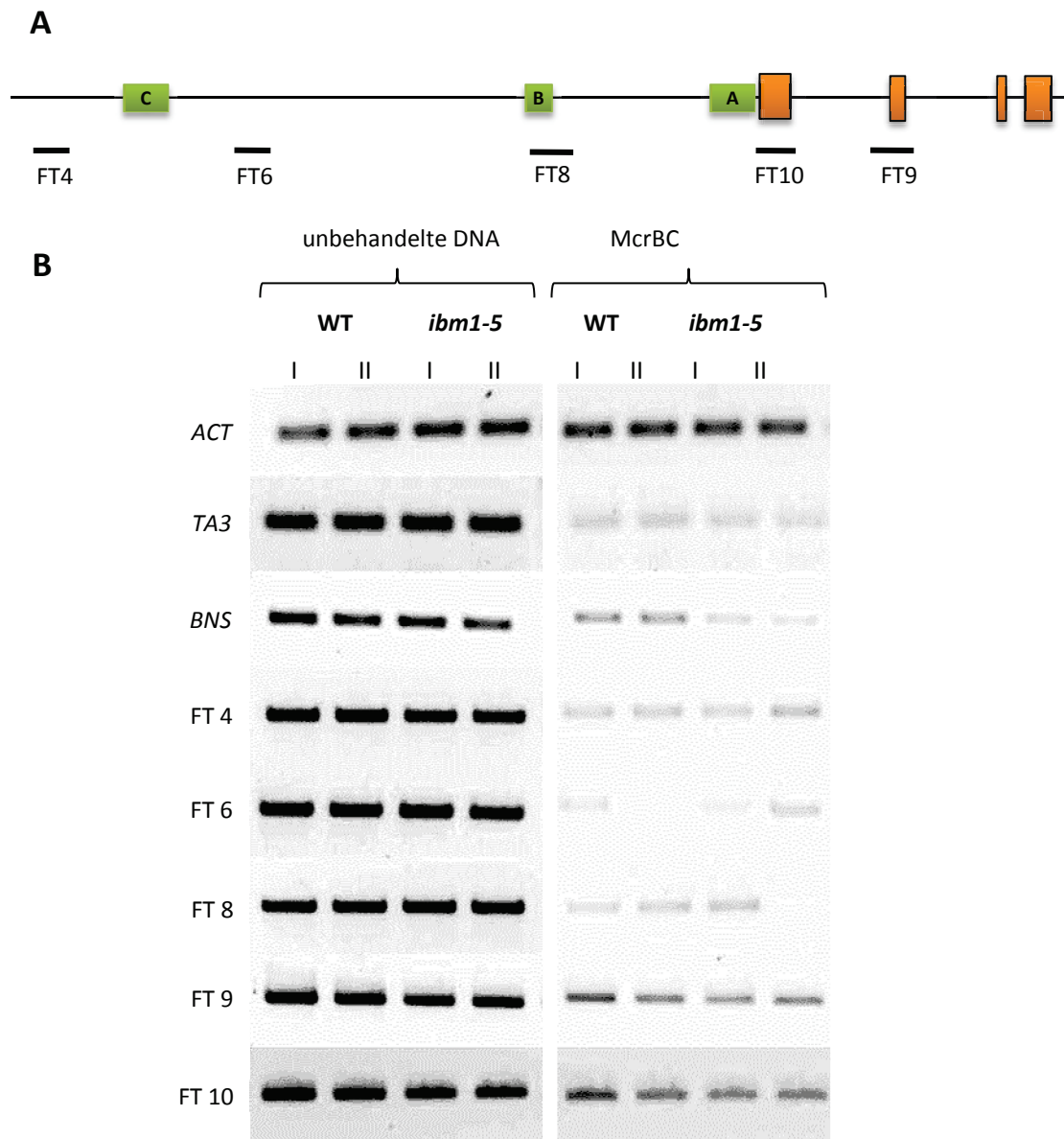
gleichbar (Abbildung 3.21). In *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten konnte eine dreifach höhere Expression von *FT* als in *ibm1-12* Mutanten ermittelt werden; eine hundertprozentige Wiederherstellung der *FT*-Expression wird jedoch nicht erreicht. Das Expressionsniveau von *FT* ist in *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten gegenüber *cmt3* um die Hälfte reduziert. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Restauration des Phänotyps in *ibm1 cmt3* Doppelmutanten mit der Wiederherstellung der *FT*-Expression in Hochblättern einhergeht.

3.4.2. Untersuchung von DNA-Methylierung am *FT*-Locus

Die Untersuchungen der Expression von Meristemidentitätsgenen in *ibm1* Mutanten haben eine Reduktion der Expression von *FT* in Hochblättern und Blüten ergeben. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die transkriptionelle Repression von *FT* in *ibm1* Mutanten mit ektopischer DNA-Methylierung am *FT*-Locus einhergeht. Die Ergebnisse der Analyse der Expression vom Reporterkonstrukt *pFT::GUS* in *ibm1-12* und *ibm1-5* Mutanten implizieren, dass *FT* am Promotor durch IBM1 reguliert wird. Der *FT*-Promotor beinhaltet drei hoch konservierte DNA-Sequenzbereiche, Block A, B und C, die für die native Expression von *FT* essentiell und auf einer Länge von 5,7 kb verteilt sind (Adrian, J. et al. 2010). Für das native Expressionsprofil von *FT* ist die gesamte 5,7 kb lange Sequenz des Promotors notwendig (Adrian, J. et al. 2010).

Die Untersuchung der DNA-Methylierung am *FT*-Locus wurde in *ibm1-5* Mutanten durchgeführt, da dieses Allel gegenüber *ibm1* Mutanten im Ökotyp Ws einen schwächeren morphologischen Phänotyp hat. Die DNA-Methylierung am *FT*-Promotor wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Mit der methylierungsabhängigen Restriktion der DNA mit McrBC kann die Präsenz der DNA-Methylierung an bestimmten Loci im Schnellverfahren überprüft werden. Jedoch können eventuell vorhandene geringe Unterschiede des Grades an DNA-Methylierung kaum nachgewiesen werden. Ebenfalls lässt sich weder die exakte Position der Methylierung in der DNA-Sequenz, noch die Art der DNA-Methylierung bestimmen. Es wurde aus der *ibm1-5* Mutante und dem Wildtyp die DNA isoliert und mit dem Enzym McrBC geschnitten. Daraufhin wurde die mit McrBC behandelte DNA der Mutante und des Wildtyps sowie die äquivalente Menge der unbehandelten DNA mit PCR amplifiziert und die Menge der Amplifikate semiquantitativ analysiert. Als Kontrolle der methylierungsabhängigen Restriktion dienten Loci, deren Methylierungszustände bekannt sind. Als Kontrolle der eingesetzten DNA-Menge wurde die unbehandelte DNA amplifiziert. Die zweite Methode der DNA-Methylierungsanalyse basiert auf chemischer Behandlung der genomischen DNA, der Bisulfit-Konversion. Bei dieser Reaktion werden alle nicht methylierten Cytosine in Thymin umgewandelt. Alle Cytosine, die eine Methylgruppe tragen, bleiben unverändert.

3.4.2.1. Methylierungsabhängige Restriktion der genomischen DNA mit McrBC

**Abbildung 3.22: Methylierungsabhängige Restriktion der DNA mit McrBC.**

A. *FT* Locus mit angegebenen Positionen, an denen DNA-Methylierung untersucht wurde. Orange Boxen repräsentieren Exons, grüne Boxen – konservierte essentielle Elemente des *FT*-Promotors (Adrian, J. et al. 2010). **B.** Methylierungsabhängige Restriktion der genomischen DNA aus Hochblättern mit McrBC. Die nicht geschnittene DNA wurde zur Kontrolle der eingesetzten DNA-Menge amplifiziert. Nebeneinander sind biologische Duplikate von Wildtyp und *ibm1-5* aufgetragen. *ACT*, *TA3* und *BNS* dienen als interne Kontrollen der DNA-Methylierung. Die Negativkontrolle *ACT* zeigt keine DNA-Methylierung, DNA wird nicht geschnitten. Das Retrotransposon *TA3* ist methyliert und unverändert in *ibm1*, wie dies für Retrotransposons in der Literatur gezeigt ist (Miura, A. et al. 2009). *BNS* zeigt tendenziös eine Anreicherung von DNA-Methylierung in *ibm1*, übereinstimmend mit der Literatur (Saze, H. et al. 2008a). Der *FT*-Locus ist an allen untersuchten Regionen methyliert, am Promotor tendenziös stärker als an der transkribierten Sequenz. Es sind keine Unterschiede in *ibm1* festzustellen.

Es wurden drei Abschnitte des Promotors (FT4, FT6, FT8) und zwei Abschnitte im Gen ausgewählt, an denen die DNA-Methylierung im Wildtyp und in der *ibm1-5* Mutante untersucht wurde. Weitere drei Loci dienten als interne Kontrollen. Das Gen *ACTIN4* (*ACT*) ist ubiquitär exprimiert und trägt daher erwartungsgemäß keine DNA-Methylierung. Es wurde als interne negative Kontrolle der DNA-Methylierung untersucht. Zur positiven Kontrolle der DNA-Methylierung wurde das Retrotransposon *TA3* untersucht, das in allen somatischen Zellen methyliert ist (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). Außerdem wurde eine dritte Kontrollregion, *BONSAI* (*BNS*), untersucht, deren Grad an Methylierung in *ibm1* höher ist, als im Wildtyp (Saze, H. et al. 2008a).

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung am *FT* Locus wurde genomische DNA aus Hochblättern von *ibm1* Mutanten und vom Wildtyp isoliert. Die Amplifikate der internen negativen Kontrolle *ACT* zeigen ohne und nach der Behandlung durch McrBC die gleiche Intensität (Abbildung 3.22). Dieses Ergebnis bestätigt, dass *ACT* keine oder sehr geringe DNA-Methylierung trägt. Die PCR-Produkte des positiven Kontrolllocus *TA3* sind nach der Behandlung der DNA mit McrBC deutlich schwächer, als die unbehandelte DNA-Ladekontrolle. Dieses Kontrollexperiment bestätigt, dass die genomische DNA von McrBC geschnitten wurde und die Restriktion methylierungsabhängig gewesen ist. Die dritte Kontrollregion, *BNS*, bestätigte die Aktivität und Spezifität von McrBC. Der 3'-Abschnitt von *BNS* ist in *ibm1* stärker methyliert, als im Wildtyp. Die Amplifikate der DNA von *ibm1* sind im Fall von beiden technischen Replikaten schwächer, als beim Wildtyp. Nach den erfolgten Kontrollexperimenten konnte die DNA-Methylierung am *FT*-Locus durchgeführt werden.

Die untersuchten DNA-Regionen des *FT*-Promotors FT4, FT6, FT8 zeigen deutlich schwächere Amplifikate nach der Behandlung der DNA mit McrBC, als in der DNA-Ladekontrolle. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass DNA-Methylierung am *FT*-Promotor vorhanden ist. Allerdings sind keine reproduzierbaren Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen *ibm1* und dem Wildtyp festzustellen. Die Analyse der DNA-Methylierung in der genomischen Sequenz von *FT* zeigt ein anderes Ergebnis. Die untersuchte Region FT9 befindet sich in der Genmitte und umfasst das zweite Exon. Die Amplifikate der mit McrBC behandelten DNA sind geringfügig schwächer, als in der DNA-Ladekontrolle. Im Vergleich zu den untersuchten Regionen des *FT*-Promotors weist die Region FT9 eine schwächere DNA-Methylierung auf. Die Region FT10 umfasst das erste Exon und das Start-Codon von *FT*. Dieser DNA-Bereich trägt laut der McrBC-Analyse schwache bis gar keine DNA-Methylierung.

Nach der Expressionsanalyse des *pFT::GUS* DNA-Konstrukts impliziert die Untersuchung der DNA-Methylierung mit McrBC, dass die Regulation von *FT* durch *IBM1* am Promotor stattfinden kann, weil dort DNA-Methylierung vorhanden ist. Die methylierungsabhängige Restriktion der genomischen DNA offenbart, dass die DNA-Methylierung am *FT*-Promotor stärker präsent ist, als in der transkribierten Sequenz.

3.4.2.2. Bisulfit-Sequenzierung des *FT*-Promotors

Die Untersuchung der DNA-Methylierung mit dem methylierungsabhängigen Restriktionsenzym McrBC hat ergeben, dass der *FT* Promotor sowohl im Wildtyp als auch in *ibm1* methyliert ist. Eventuell vorhandene Unterschiede in der Methylierung zwischen *ibm1* und Wildtyp, welche die Reprimierung von *FT* in *ibm1* erklären könnten, können unter dem Detektionsniveau der McrBC-Restriktion und der anschließenden PCR liegen. Eine genaue Untersuchung der DNA-Methylierung erlaubt die Bisulfit-Sequenzierung. Diese experimentelle Methode erlaubt eine Quantifizierung der Methylierung von DNA-Proben, deren Präzision von der Anzahl der sequenzierten Klone abhängt, und eine Unterscheidung der drei Typen von DNA-Methylierung, CG, CHG und CHH.

Für die Bisulfit-Sequenzierung wurde dasselbe DNA-Ausgangsmaterial aus Hochblättern verwendet, wie bei der McrBC-Analyse. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Abschnitte des *FT*-Promotors fiel die Wahl auf einen der drei konservierten Bereiche, Block A, welcher unmittelbar vor dem Start-Codon liegt und für die Transkription von *FT* essentiell ist (Abbildung 3.24) (Adrian, J. et al. 2010). Zur Untersuchung eines distalen Bereichs des *FT*-Promotors und als interne Kontrolle der Bisulfit-Konversion wurde die vom Start-Codon 2,6 kb in 5'-Richtung entfernte DNA-Region FTe ausgewählt.

Vor dem Beginn der Bisulfit-Sequenzierung vom *FT*-Locus wurden Kontrollen der Bisulfit-Konversion und der Primer für die Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt (Abbildung 3.23). Dazu wurden zwei Kontroll-Loci untersucht, *ACTIN* und *LINE*. *ACTIN* ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, das nicht methyliert ist. *LINE* ist ein Retrotransposon, das einen hohen Grad an DNA-Methylierung trägt (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). Für jeweils einen Bereich jedes Kontroll-Locus wurden zwei Paare von Primern erstellt: ein Primerpaar, das nur genomische, nicht konvertierte DNA bindet und ein anderes, das nur vollständig konvertierte DNA bindet. Als Matrizen-DNA für die PCR-Reaktionen dienten die bisulfit-behandelte und unbehandelte genomische DNA. Um zu testen, ob die degenerierten Primer, die für die Amplifikation und Sequenzierung bisulfit-behandelter DNA des *FT* Locus verwendet werden sollten, keine Version

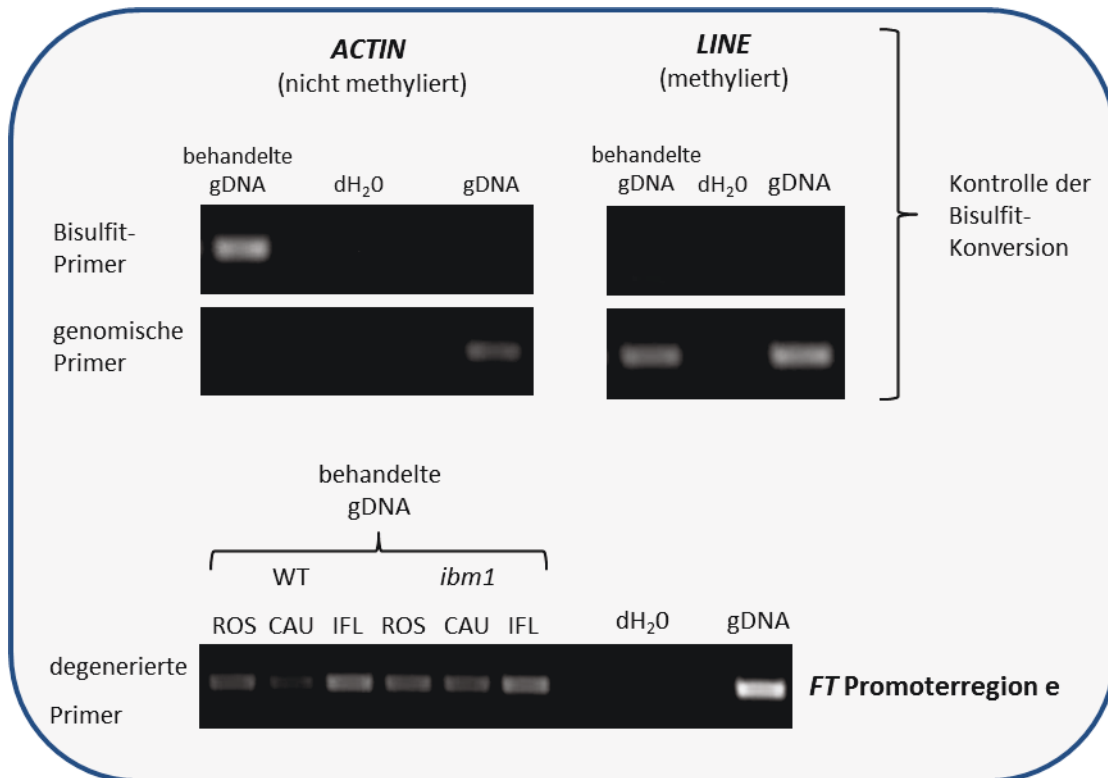


Abbildung 3.23: Kontrolle der Bisulfite-Konversion.

PCR mit spezifischen Primern, die entweder konvertierte oder nicht konvertierte DNA binden. Locus *ACTIN*, im Wt nicht methyliert, dient als positive Kontrolle, *LINE*, stark methyliert, – als negative Kontrolle der Konversion. Degenerierte Primer binden beide Versionen der DNA.

der DNA diskriminieren, wurden sie zur Kontrolle in je einer PCR-Reaktion mit bisulfite-behandelten und nicht behandelten genomischer DNA eingesetzt.

Die Kontrolle der Bisulfite-Konversion bestätigte die Konvertierung der nicht methylierten DNA am Kontroll-Locus *ACTIN*. Die PCR-Reaktion mit bisulfite-behandelter DNA und Oligonukleotiden, die die native genomische Sequenz von *ACTIN* binden, konnte kein sichtbares Produkt amplifizieren, dagegen konnte in einer weiteren PCR-Reaktion mit der selben Matrizen-DNA jedoch mit Oligonukleotiden, die vollständig konvertierte DNA binden, ein gut nachweisbares Produkt amplifiziert werden. Die stark methylierte DNA des zweiten Kontroll-Locus *LINE*, so zeigte das Kontrollexperiment, wurde nicht konvertiert. Die PCR-Reaktion mit bisulfite-behandelten Matrizen-DNA und Oligonukleotiden, die konvertierte DNA von *LINE* binden, konnte kein sichtbares Produkt amplifizieren. Eine weitere Reaktion mit Oligonukleotiden, die die native genomische Sequenz von *LINE* binden, konnte ein gut nachweisbares Produkt amplifizieren.

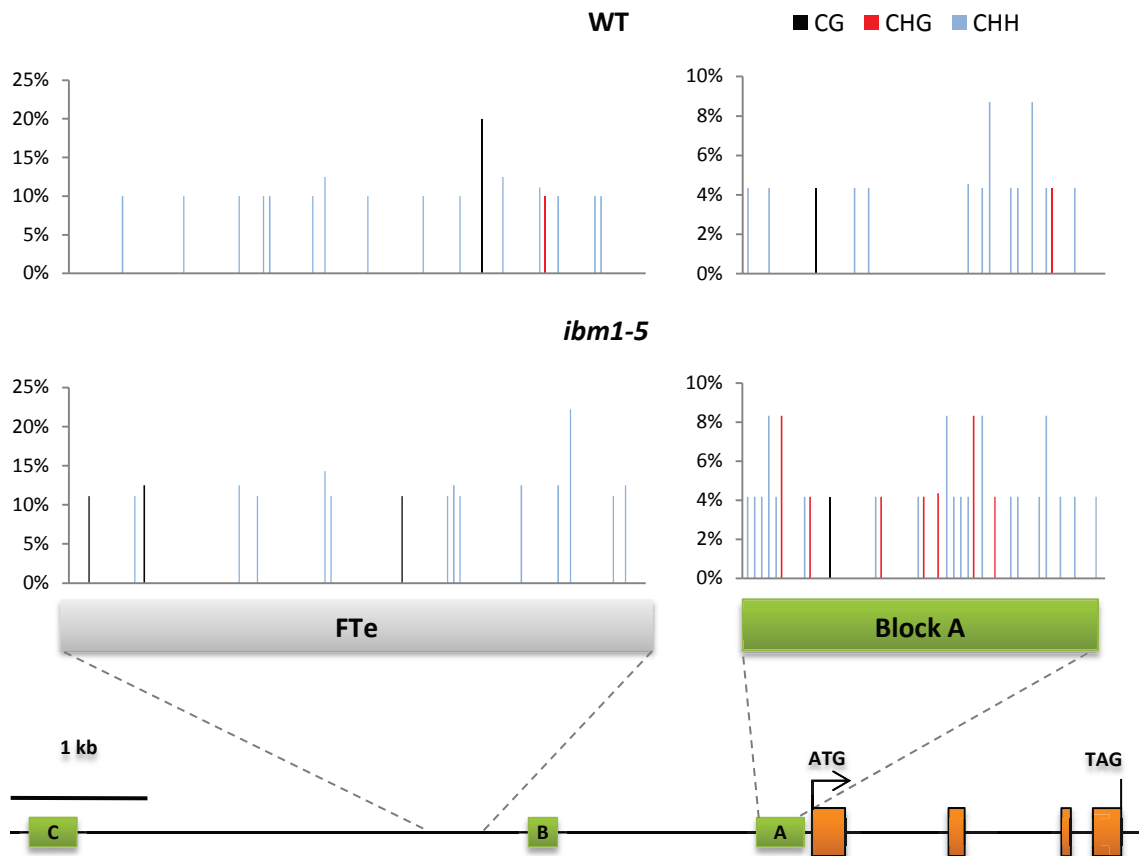


Abbildung 3.24: DNA-Methylierung am *FT*-Promotor in *ibm1-5* Mutanten.

Bisulfit-Sequenzierung des konservierten Promotorelements Block A in Hochblättern von *ibm1-5* Mutanten und einer weiteren Promotorregion FTe als Kontrolle. Der prozentuale Anteil der methylierten Cytosine ist durch vertikale Balken dargestellt (schwarz, CG; rot, CHG; blau, CHH). Unten ist der *FT* Locus dargestellt. Orangene Boxen stehen für Exons, grüne Boxen repräsentieren konservierte Elemente des *FT*-Promotors.

Die Bisulfit-Sequenzierung von Block A zeigt, dass dieser Bereich des Promotors im Wildtyp methyliert ist. Der überrepräsentierte Methylierungstyp ist CHH, während die symmetrische CG- und CHG-Methylierungen schwächer sind. Die Bisulfit-Daten von *ibm1* haben eine Hypermethylierung ergeben (Abbildung 3.24). Der Vergleich der drei Typen von DNA-Methylierungen zeigt, dass speziell die CHG-Methylierung in *ibm1* stark erhöht ist (Abbildung 3.25). Diese wird durch den moderaten Anstieg der CHH-Methylierung begleitet, während die CG-Methylierung in *ibm1* unverändert ist. Die Analyse des DNA-Sequenzkontexts der Cytosine zeigt, dass 69% aller Cytosine des Blocks A im CHH-Kontext vorliegen, 22% - im CHG-Kontext und 10% - im CG-Kontext. Die vorliegende Überrepräsentanz der Cytosine im CHH-Kontext um Faktor drei gegenüber den Cytosinen im CHG-Kontext und der Vergleich von Wildtyp und Mutante zeigen eine starke CHG-Hypermethylierung in *ibm1* (Abbildung 3.25).

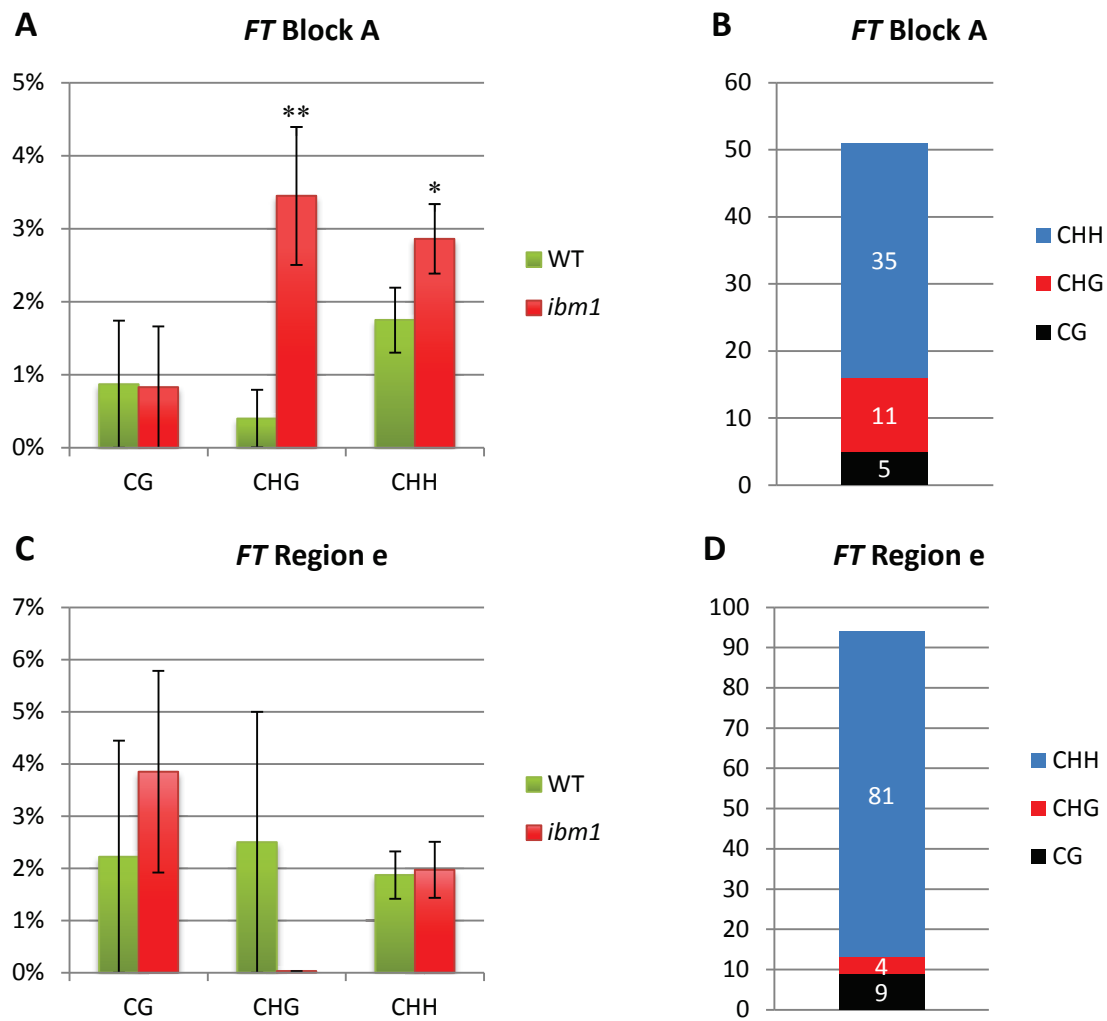


Abbildung 3.25: Typenspezifischer Vergleich der DNA-Methylierung in *ibm1-5* und Wildtyp.

Die Fehlerbalken ergeben sich aus den gemittelten Anteilen von methylierten Cytosinen pro Cytosin-Position und pro Klon ($n = 24$ pro Genotyp). **A.** Analyse der drei Typen der DNA-Methylierung am Block A in Wt und *ibm1-5*. Keine Veränderung der CG-Methylierung in *ibm1*, eine knapp signifikante Erhöhung der CHH-Methylierung in *ibm1* ($p < 0,05$), eine starke, signifikante Erhöhung der CHG-Methylierung in *ibm1* ($p < 0,01$). **B.** Anzahl der Cytosine in deren Sequenzkontexten im Block A. Obwohl die Cytosine vorwiegend im CHH-Kontext vorliegen, ist die Anreicherung des CHG-Typs stärker und spezifischer. **C.** Analyse der drei Typen der DNA-Methylierung an der Promotorregion FTe in Wt und *ibm1*. Keine signifikante Veränderung der DNA-Methylierung in *ibm1* ($p > 0,05$). **D.** Anzahl der Cytosine in deren Sequenzkontexten in der Promotorregion FTe.

Die Bisulfit-Sequenzierung der distalen Promotorregion FTe zeigte, dass auch diese Region des Promotors methyliert ist (Abbildung 3.24). Die DNA-Sequenzanalyse ergab, dass 86% der Cytosine in dieser Region im CHH-Kontext vorliegen, 4% - im CHG-Kontext und 10% - im CG-Kontext (Abbildung 3.25). In *ibm1* ist ein leichter Anstieg der CG-Methylierung zu erkennen, jedoch ist die ohnehin schwache CHG-Methylierung im Wildtyp in *ibm1* gar nicht vorhanden. Die CHH-Methylierung ist in *ibm1* gleich stark wie im Wildtyp.

Zum einen hat die Bisulfit-Sequenzierung die vorhandene DNA-Methylierung am *FT*-Promotor in verschiedenen Regionen bestätigt. Zum anderen konnte diese präzisere Methode Unterschiede des Methylierungsstatus zwischen *ibm1* und Wildtyp aufdecken. Der hochkonservierte und für die Transkription von *FT* essentielle Bereich Block A trägt in *ibm1* ektopische Methylierung im CHG-Kontext. CHG-Methylierung ist der DNA-Methylierungstyp, der mit der H3K9me2 Modifikation des Chromatins korreliert und durch *CMT3* katalysiert wird, daher ist eine entsprechende spezifische Erhöhung von CHG erwartet und im Einklang mit der Literatur (Miura, A. et al. 2009, Saze, H. et al. 2008a).

3.4.3. Untersuchung von Histonmodifikationen am *FT* Locus

Die genetischen und molekularbiologischen Experimente zeigten, dass bei der Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität *IBM1* antagonistisch zu *CMT3* wirkt. *CMT3* vermittelt DNA-Methylierung des CHG-Typs. Diese und die Histonmodifikation H3K9me2 korrelieren genomweit und sind im Großteil im Heterochromatin lokalisiert (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). In Anbetracht dessen, dass *IBM1* eine Histon-Demethylase mit H3K9me2-Spezifität ist und die H3K9me2 Chromatinmodifikation mit der DNA-Methylierung des CHG-Typs korreliert, sollte mit einer Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) mit H3K9me2-Antikörpern untersucht werden, ob in *ibm1* Mutanten H3K9me2 am *FT*-Locus lokalisiert ist und ob die Histonmethylierung und die DNA-Methylierung am Block A kolokalisiert sind. Darüber hinaus sollte mit der Untersuchung von H3K9me2 am *FT* Locus Indizien darüber erhalten werden, ob die Transkription von *FT* auf direktem Weg von *IBM1* reguliert wird, durch Entfernung der H3K9me2- und DNA-Methylierung.

Für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurden unter Langtag-Bedingungen sieben Wochen lang der Wildtyp Col-0 und acht Wochen lang die *ibm1-5* Mutanten der ersten und zweiten homozygoten Generation herangezogen, um die Pflanzenlinien beim gleichen Entwicklungsstadium zu ernten. Das *ibm1-5* Allel wurde gewählt, da *ibm1* Allele im Ökotyp Col keinen starken morphologischen Phänotyp haben und somit vergleichbares Gewebe von Wildtyp und Mutanten analysiert werden kann. Die zweite homozygote Generation von *ibm1-5* Mutanten wurde analysiert, um einerseits eine mögliche Anreicherung von H3K9me2 von Generation zu Generation zu untersuchen und andererseits für den Fall, es ließe sich keine H3K9me2 in der ersten Generation nachweisen. Wie bei der DNA-Methylierungsanalyse, wurden für das Experiment die Hochblätter verwendet.

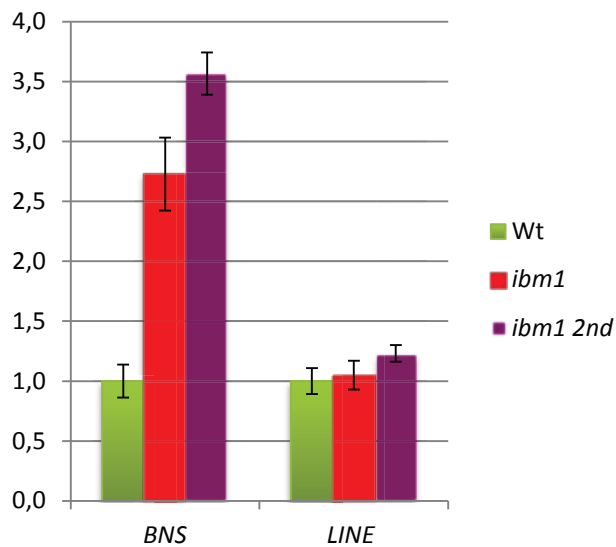


Abbildung 3.26: Interne Kontrolle des ChIP: Anreicherung von H3K9me2 bei BNS in *ibm1* Mutanten.

ChIP mit H3K9me2-Antikörpern von der 3'-Region des Locus *BNS* und des benachbarten heterochromatischen *LINE*-Elements. H3K9me2 ist in *BNS* in *ibm1* Mutanten angereichert, keine Anreicherung im heterochromatischen *LINE*. Die Werteskala gibt die Anreicherung von H3K9me2 gegenüber dem Wildtyp an. Quantitative PCR zur Ermittlung der IP. Für jeden untersuchten Genotyp bilden die Daten das Mittel von drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die IP ist auf den jeweiligen Input, die IP des Kontroll-Locus *TA3* und des Wildtyps normalisiert. (*ibm1 2nd* = *ibm1* Mutanten zweiter homozygoten Generation.)

Die H3K9me2-Spezifität der ChIP wurde dadurch ermittelt, indem die IP von verschiedenen Kontroll-Loci bestimmt wurde. Zuerst wurden für die Qualitätskontrolle der α H3K9me2-ChIP solche Loci untersucht, die aus zahlreichen Studien bekannterweise hohen Grad an H3K9me2 tragen. Am meisten findet man in *A. thaliana* solche Sequenzen im Heterochromatin, welches dicht gepackt, transkriptionell inaktiv und dessen DNA in allen drei Kontexten, CG, CHG und CHH, hoch methyliert ist (Jenuwein, T. and Allis, C. D. 2001, Martienssen, R. A. and Colot, V. 2001, Vermaak, D. et al. 2003, Zilberman, D. et al. 2007). Das Heterochromatin enthält viele stillgelegte und transkriptionell transposable Elemente, deren zwei Vertreter, *TA3* und *LINE*, als Positivkontrolle des α H3K9me2-ChIP fungieren. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass *ibm1* Mutanten in tausenden von Genen ektopische DNA-Methylierung des CHG-Typs und H3K9me2 induzieren, Retroelemente, dagegen, bleiben von dessen Funktion unangestastet (Miura, A. et al. 2009, Saze, H. et al. 2008a).

Die ermittelte relative IP der Positivkontrollen lag bei 8 bis 12% für *TA3* und 5,3 bis 8,3% für *LINE* (Abbildung 5.1). Die Berechnung der relativen IP von *ACTIN* kam der Detektionsgrenze der quantitativen PCR nahe. Die ermittelte IP lag bei 0,03 bis 0,06% im Verhältnis zum Input. Damit ergibt sich für *TA3* eine Anreicherung über *ACTIN* um den Faktor 140 bis 250. Zugleich wurde die IP von *ACTIN* zur Definition des Hintergrundniveaus herangezogen und galt bei der Bewertung der IPs von weiteren Loci als unterer Schwellenwert der Detektion von H3K9me2.

Die Untersuchung der IP an weiteren Loci diente als interne Kontrolle der ChIP und als Gewebekontrolle von *ibm1*. Der an *LINE* benachbarte euchromatische Locus *BONSAI* (*BNS*), trägt in

ibm1 in seinem 3'-Bereich ektopisches H3K9me2 (Saze, H. et al. 2008a). Durch Ermittlung einer entsprechenden Anreicherung von H3K9me2 in *ibm1* konnte daher eine Aussage über die Qualität des ChIP-Experiments treffen. Die ermittelte relative IP von *BNS* lag bei 0,5 bis 2% über dem Input und entspricht einer deutlichen Anreicherung über *ACTIN* als Hintergrund (Abbildung 5.1). Die Normalisierung der IP von *BNS* auf die Positivkontrolle *TA3* ermöglicht das Errechnen einer Anreicherung von H3K9me2 in *ibm1* Mutanten um Faktor 2,7 und einer stärkeren Anreicherung in *ibm1* Mutanten zweiter homozygoten Generation um den Faktor 3,6 (Abbildung 3.26).

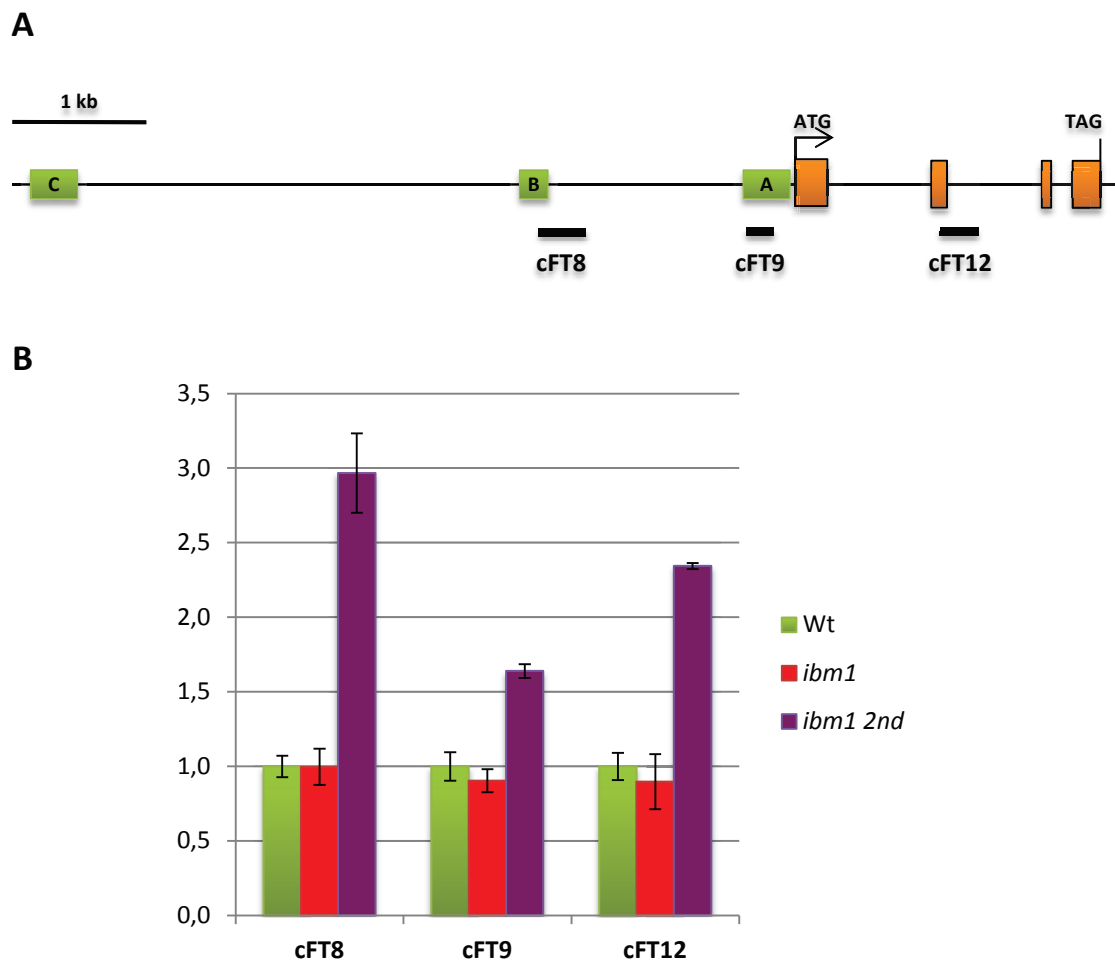


Abbildung 3.27: Anreicherung von H3K9me2 am *FT*-Locus in *ibm1* Mutanten.

A. Schematische Darstellung des *FT* Locus. Orange Boxen entsprechen den Exons, die dazwischen liegenden Bereiche – den Introns, grüne Boxen – den drei für die Expression von *FT* essentiellen konservierten Elementen des *FT*-Promotors, Block A, B und C. cFT8, cFT9, cFT12 sind Positionen des *FT*-Locus, die im ChIP auf die Anreicherung von H3K9me2 untersucht wurden. **B.** H3K9me2 ist angereichert in cFT8, cFT9 und cFT12 in *ibm1* Mutanten zweiter homozygoten Generation. Die Werte der präzipitierten DNA wurden gemittelt von drei technischen Replikaten und normalisiert auf den jeweiligen Input, auf die IP des Kontroll-Locus *TA3* und des Wildtyps.

Zusammenfassend sind die Retroelemente *TA3* und *LINE* in den IP-Reaktionen am stärksten angereichert, während *ACTIN* kaum detektierbar ist. Der 3'-Bereich des Locus *BNS* ist in den IP-Reaktionen von *ibm1* Mutanten angereichert und progressiert in der zweiten homozygoten Generation, während *LINE* im Wildtyp und in *ibm1* gleich stark angereichert ist.

Zur Untersuchung von H3K9me2 am *FT*-Locus wurden drei Testregionen ausgewählt (Abbildung 3.27 A). Der Testabschnitt cFT8 liegt im distalen Bereich der *FT*-Promotors und umfasst die konservierte Region Block B, die einem potenzielles Enhancerelement entspricht (Adrian, J. et al. 2010). Der Testabschnitt cFT9 liegt im proximalen Bereich des Promotors und umfasst den für die Transkription essentiellen Block A, an dem in *ibm1* Mutanten die ektopische CHG-Methylierung detektiert wurde. Der Testabschnitt cFT12 liegt im *FT*-Gen und umfasst das zweite Exon und das zweite Intron. Bereits im Wildtyp kann eine H3K9me2-Anreicherung an allen drei Testregionen detektiert werden, die 2,6 bis 3,5-fach über dem als Hintergrundniveau definierten *ACTIN* liegt (Abbildung 5.1). In *ibm1* Mutanten erster und zweiter homozygoter Generationen sind ebenfalls alle drei Testregionen über *ACTIN* angereichert, wobei H3K9me2 an den Regionen cFT8 und cFT12 in *ibm1* Mutanten zweiter homozygoter Generation am stärksten angereichert ist. Um das H3K9me2-Niveau zwischen Wildtyp und *ibm1* Mutanten zu vergleichen, musste die auf den Input normalisierte absolute IP von *FT* zusätzlich auf die Positivkontrolle *TA3* bezogen werden. Damit wurden mögliche experimentelle Abweichungen zwischen verschiedenen IP-Reaktionen normalisiert. Es konnte eine H3K9me2-Anreicherung an allen drei Testregionen in *ibm1* Mutanten der zweiten homozygoten Generation ermittelt werden (Abbildung 3.27 B). In *ibm1* Mutanten erster homozygoter Generation konnte keine H3K9me2-Anreicherung ermittelt werden.

4. Diskussion

4.1. *IBM1* reguliert den Übergang zum Blühen in *A. thaliana*

Während des Lebenszyklus und gesamten oberirdischen Wachstums von höheren Pflanzen werden durch das Sprossapikalmeristem (SAM) neue Organe gebildet. Das SAM beinhaltet undifferenzierte Zellen, die verschiedene Organe entwickeln können. Für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Organidentitäten sind spezifische Genexpressionsprofile sowie deren Erhaltung über Zellteilungen hinweg notwendig. Epigenetische Regulation der Genexpression durch Histon- und DNA-Methylierung spielt dabei eine wichtige Rolle. Zur Untersuchung der Rolle von Histon-Demethylasen in der Entwicklung von *A. thaliana* wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit in einer Studie von Histon-Demethylase-Mutanten mit Defekten in der Differenzierung die *ibm1-12* Mutante identifiziert (Gregor Klein, 2008, Diplomarbeit). Der Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten äußert sich durch multiple Reversionen von floralen Meristemen (FM) zu Infloreszenzmeristemen (IM). Da ein FM bei der Entwicklung einer Blüte determiniert und ein IM stets neue laterale FM produziert und die meristematische Zellpopulation aufrechterhält, entspricht die Reversion eines FM zu einem IM der Aufgabe einer determinierten Zellidentität und der Rückkehr zu einer indeterminierten Zellidentität. Die Identifikation des *ibm1-12*-Phänotyps rückt *IBM1* als H3K9me2-spezifische Histon-Demethylase in die Rolle eines entwicklungsrelevanten Regulators der Zellidentität, der durch epigenetische Modifikationen Zielgene und die Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität reguliert. In dieser Arbeit wurde der zugrunde liegende Mechanismus, durch den *IBM1* die Entwicklung von FM reguliert, untersucht.

4.1.1. Die Entwicklungsdefekte der Infloreszenz beruhen auf dem Funktionsverlust von *IBM1* und seiner JmjC Domäne

Die erfolgte Komplementation des *ibm1-12* Phänotyps durch *IBM1* exprimierende Transgene *IBM1::IBM1-GFP*, *35S::IBM1* und *35S::IBM1-GFP* räumt die Möglichkeit einer artifiziellen Ursache für den Phänotyp aus, der beispielsweise durch Mehrfachinsertion der T-DNA herbeigeführt werden könnte und zum Ausschalten von weiteren Genen geführt hätte. Beide Transgene exprimieren *IBM1*, im ersten Fall auf der Basis der transkribierten Sequenz inklusive des endogenen Promotors, im zweiten Fall – unter einem konstitutiven Überexpressionspromotor und der cDNA-Sequenz von *IBM1*. Darüber hinaus konnte die Expression von *IBM1* mit einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum der katalytischen JmjC Domäne, der im Orthologen Protein JHDM2A zum Verlust der H3K9me2-Demethylase-Aktivität führt, den *ibm1-12* Phänotyp nicht komplementieren, obwohl es sich dabei um ein Transgen der selben Basis wie

35S::*IBM1* handelt, das den Phänotyp komplementiert. Daher beruht der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten auf dem Funktionsverlust von *IBM1* und der katalytischen Funktion seiner JmjC Domäne.

4.1.2. Repression von floralen Meristemidentitätsgenen in *ibm1* korreliert mit dem Phänotyp

Der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten zeigt Defekte bei der Spezifizierung und Aufrechterhaltung von floraler Meristemidentität. Nach der Blühinduktion ist beim Wildtyp von *A. thaliana* die Transformation des SAM zur Entwicklung von Blüten endgültig und stabil, es werden ausschließlich Blüten entwickelt. Das SAM von *ibm1-12* Mutanten entwickelt auch nach der Blühinduktion zu sekundären Infloreszenzen transformierte Blüten, jedoch ohne Hochblatt an deren Basis, das bei einem sekundären IM beim Wildtyp entwickelt wird. Ebenfalls entgegen der Entwicklung des Wildtyps werden solche Organe auch nach erfolgter Produktion von Blüten entwickelt. In *A. thaliana* werden beide Meristeme, IM und FM, in der Achsel eines angelegten Blattes entwickelt, das im Fall eines IM zu einem Hochblatt auswächst und dessen Entwicklung bei der Anlage eines FM unterdrückt wird (Long, J. and Barton, M. K. 2000). Demzufolge sind die Blattanlagen bei beiden Typen von Meristemen vorhanden, die jedoch bei einem FM rudimentär bleiben. Vor diesem Hintergrund können die fehlenden Hochblätter an der Basis von sekundären IM auf die Reversion eines FM zu einem IM hindeuten. Dieser Phänotyp kann als Reversion bezeichnet werden, da die Entwicklung von determinierten Meristemen (FM) zur Entwicklung von entwicklungschronologisch früheren, indeterminierten Meristemen (IM) zurückkehrt.

Die revertierten bzw. indeterminierten FM bei *ibm1-12* Mutanten produzieren Brakteen anstelle von Sepalen, die den Blütenorganen des ersten Wirtels eines FM entsprechen und deren Entwicklung von Klasse A Genen nach dem ABC-Modell reguliert werden (Krizek, B. A. and Fletcher, J. C. 2005). Eines dieser Gene ist *API*, und vergleichbare Meristemidentitätsdefekte sind von *ap1* Mutanten bekannt. Mutationen von *API* resultieren in der Transformation von Sepalen zu blattähnlichen Organen, während Organe des zweiten Wirtels nicht oder in wenigen Fällen zu petaloiden Organen entwickelt werden (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990). Vereinzelt entwickeln *ibm1-12* Mutanten weitere Phänotypmerkmale, die bei *ap1* Mutanten auftreten. Anstelle von Sepalen werden sekundäre Blüten oder Infloreszenzen entwickelt (Abbildung 3.3 D) (Irish, V. F. and Sussex, I. M. 1990, Mandel, M. A. et al. 1992). Dieser Phänotyp kann als florale Reversion interpretiert werden, zumal ein determiniertes Meristem, das Blütenorgane entwickelt, zur Entwicklung einer früheren Identität einer Blüte oder Infloreszenz zurückkehrt.

Die mit *ap1* Mutanten vergleichbare Phänotypmerkmale des *ibm1-12* Phänotyps korrelieren mit den Expressionsanalysen in *ibm1* Mutanten, die eine Reduktion von *API* in Infloreszenzen und Blüten zeigen (Abbildung 3.14, Abbildung 3.15). Nach der Spezifizierung der floralen Meristemidentität ist im Wildtyp die Expression von *API* in Sepalen und Petalen zu finden. Bei Blüten von *ap1* Mutanten ist die Anzahl der Petalen stark reduziert und zum Teil in Stamen transformiert. Die Sepalen sind zu Brakteen transformiert, in deren Achseln neue florale Meristeme gebildet werden. Obschon *API* in den Infloreszenzen und Blüten von *ibm1-12* Mutanten reprimiert ist, unterscheidet sich der *ap1*-Infloreszenzphänotyp vom Phänotyp der *ibm1-12* Mutanten grundlegend. *ibm1-12* Mutanten entwickeln keine derart starken Blütenphänotypen wie *ap1* Mutanten, was durch die restliche Expression von *API* erklärt werden könnte.

ibm1-12 Mutanten entwickeln eine erhöhte Anzahl von Hochblättern mit axillären sekundären IM, einige der danach entwickelten Blüten sind abnormal und zeigen Charakteristika von sekundären Infloreszenzen. *lfy* Mutanten haben vergleichbare phänotypische Aspekte (Weigel, D. et al. 1992). Das *lfy* IM entwickelt ebenfalls eine erhöhte Anzahl an sekundären Infloreszenzen und bis zum Ende des Lebenszyklus abnormale Blüten mit Charakteristika von sekundären Infloreszenzen (Schultz, E. A. and Haughn, G. W. 1991, Weigel, D. et al. 1992). Die Blüten werden oft mit unterstehenden Brakteen entwickelt. In der Übergangszone der Infloreszenz von sekundären IM zu FM werden zuerst zu Infloreszenzen komplett transformierte Blüten entwickelt und später – partiell transformierte Blüten. Bei *ibm1-12* Mutanten ist eine vergleichbare Entwicklung von Organen zu finden. Der Phänotyp ist durch zu Infloreszenzen transformierte Blüten charakterisiert. Anders als bei *lfy* Mutanten kommt es bei *ibm1-12* Mutanten im weiteren Entwicklungsverlauf zur Entwicklung von Blüten, jedoch bleibt der Übergang zu deren Entwicklung nicht endgültig. Nach erfolgter Bildung von Blüten werden zu Infloreszenzen transformierte Blüten entwickelt. Im Vergleich mit starken *lfy* Allelen, bei denen alle Blüten entweder komplett oder partiell transformiert sind, ist der *ibm1-12* Phänotyp milder (Weigel, D. et al. 1992). Dies könnte durch die moderate Reduktion der *LFY*-Expression in *ibm1-12* Mutanten erklärt werden. Schwache *lfy*-Allele zeigen eher mit *ibm1-12* Mutanten vergleichbare Defekte der FM-Entwicklung. Bei beiden sind es die ersten Blüten, die Charakteristika von Infloreszenzen zeigen (Abbildung 3.4) (Weigel, D. et al. 1992). Im weiteren Entwicklungsverlauf entwickeln sowohl schwache *lfy-5* Allele, als auch *ibm1-12* Mutanten Blüten ohne Brakteen.

LFY wird für die Transformation des Sprossapikalmeristems zur Produktion von floralen Meristemen und zur Aktivierung von *API* benötigt (Hempel, F. D. et al. 1997, Schultz, E. A. and Haughn, G. W. 1991, Weigel, D. et al. 1992). Die Expression beider Gene, die eine zentrale Rolle bei der Spezifikation und Determination von floraler Meristemidentität spielen, ist in *ibm1*

Mutanten partiell reduziert, weshalb der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten vermutlich nicht dieselbe Ausprägung wie die Einzelmутanten *lfy* und *ap1* zeigt. Da *LFY* und *API* in synergistischer Weise für die Entwicklung von FM verantwortlich sind, könnte der im Vergleich zu starken *lfy* und *ap1* Allelen mildere *ibm1-12* Phänotyp aufgrund der Reduktion beider Gene zustande kommen. Untersuchungen des Phänotyps von *lfy-5 ap1-1* Doppelmutanten zeigen, dass der Übergang zur Blütenentwicklung im Vergleich zum schwachen *lfy-5* Allel weniger deutlich ist (Weigel, D. et al. 1992). Es wird eine höhere Anzahl an transformierten Blüten produziert.

4.1.3. Die *cal* Mutation verstärkt den *ibm1* Phänotyp

Um die florale Reversion bei *ibm1-12* Mutanten zu erklären, mussten weitere Regulatoren berücksichtigt und untersucht werden, die bei der Determinierung der floralen Meristemidentität eine Rolle spielen. Der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten wurde nur im Ökotyp Wassilewskija gefunden. Zwei weitere Allele in Ws, *ibm1-11* und *ibm1-13*, entwickeln sehr ähnliche Phänotypmerkmale. Die *ibm1* Allele in den Ökotypen Col und Ler entwickeln hingegen keine florale Reversion (s. Kapitel 3.1.4). Die Exklusivität des Infloreszenzphänotyps von *ibm1-12* Mutanten im Ökotyp Ws führte zur Annahme, dass der *ibm1-12*-Phänotyp in Ws durch den genetischen Hintergrund des Ökotyps verstärkt wird. Das *API*-Homolog *CAL* ist in Ws mutiert, sodass kein funktionsfähiges Protein gebildet wird (Kempin, S. A. et al. 1995). *CAL* ist in redundanter Weise mit *API* für die Spezifizierung von floralen Meristemen zuständig (Kempin, S. A. et al. 1995, Mandel, M. A. et al. 1992, Mandel, M. A. and Yanofsky, M. F. 1995). Die *cal* Mutation allein führt zu keinem morphologisch offensichtlichen Phänotyp. Die Mutation des hoch homologen, redundant agierenden *APETALA1* (*API*) führt in *ap1 cal* Doppelmutanten zu histologisch vergleichbaren Entwicklungsdefekten der floralen Meristemidentität mit den *ibm1-12* Mutanten. Sie entwickeln Reversionen der floralen Meristeme zu Infloreszenzmeristemen, die anstelle von Blüten weitere Infloreszenzmeristeme bilden (Bowman, J. L. et al. 1993, (Kempin, S. A. et al. 1995).

Daher lag die Vermutung nahe, dass die *cal* Mutation im Ökotyp Ws den Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten verstärken könnte. Dadurch, dass in *ibm1* Mutanten die Expression von *API* nur reduziert ist, könne erklärt werden, weswegen es bei *ibm1-12* Mutanten zu nicht so starken Phänotypen wie bei *ap1 cal* Doppelmutanten kommt. Um die Rolle von *CAL* in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wurde ein das *cal-6* Allel im Columbia Hintergrund in das *ibm1-5* Allel (ebenfalls Col) eingeführt.

Die *ibm1-5 cal* Doppelmutanten entwickeln indeterminierte florale Meristeme mit Charakteristika von Infloreszenzen und florale Reversion. Durch dieses Experiment wurde bestätigt, dass das intakte *CAL* im Ökotyp Columbia den Infloreszenzphänotyp von *ibm1-5* unterdrückt, und nahegelegt, dass die natürliche *cal* Mutation im Ökotyp Wassilewskija den *ibm1-12* Phänotyp verstärkt. Nichtsdestoweniger ist der Phänotyp von *ibm1-5 cal* Doppelmutanten schwächer als von *ibm1-12* Mutanten (Abbildung 3.5, Abbildung 3.7). Weitere Faktoren im genetischen Hintergrund von Ws sind demnach mögliche Ursachen für die stärkeren Defekte bei der Entwicklung von Blüten bei *ibm1-12* Mutanten. Zu den Kandidaten solcher Faktoren gehört das *FT*-Homolog *TSF*, das in Ws ebenfalls mutiert ist (Yamaguchi, A. et al. 2005). Zusätzlich zur *cal* Mutation könnte die Kombination des mutierten *tsf* in Ws mit der Reprimierung von *FT* durch *IBM1* die Entwicklung von floralen Meristemen beeinträchtigen.

4.1.4. Regulation der floralen Meristemidentität durch *IBM1* offenbart eine erweiterte Funktion von *FT* und dessen gewebespezifische Regulation

Unter den von *IBM1* positiv regulierten Genen, die in der Entwicklung des floralen Meristems eine Rolle spielen könnten, wurde neben *LFY* und *API* der florale Integrator *FT* identifiziert. Der Microarray von *ibm1-12* Mutanten zeigt eine Repression von *FT* in Infloreszenzen, die deutlich stärker ist, als die Repression von *API* und weiteren Blütenorgane-spezifisierenden Genen. Die starke Repression von *FT* konnte mittels quantitativer RT-PCR in Infloreszenzen von *ibm1-12* (Ws) und *ibm1-5* (Col) Allelen verifiziert werden. Außerdem konnte eine Repression von *FT* in Hochblättern von *ibm1* Mutanten detektiert werden. Dies konnte mittels qRT-PCR und *pFT::GUS*-Expression in *ibm1-12* und *ibm1-5* Allelen gezeigt werden. Interessanterweise ist *pFT::GUS* in Sepalen und Blütenstielen von *ibm1-12* und *ibm1-5* Mutanten vergleichbar exprimiert wie im Wildtyp, wohingegen in Hochblättern deutliche Unterschiede zwischen *ibm1* Mutanten und dem Wildtyp sowohl spatial als auch in der Intensität festzustellen sind. Im Wildtyp scheint das Expressionsprofil in Hochblättern mit dem Expressionsmuster in Rosettenblättern vergleichbar zu sein: *FT* wird im gesamten sekundären Leitgewebe der Blätter exprimiert. In *ibm1* Mutanten ist lediglich geringe, unregelmäßige Expression im distalen Bereich von Hochblättern festzustellen.

Die Expressionsanalysen von *FT* durch quantitative RT-PCR und Promotorfusion mit dem GUS-Reportergen (*pFT::GUS*) zeigen, dass *FT* nicht in allen Gewebe von *IBM1* im gleichen Ausmaß reguliert wird. In Rosettenblättern von *ibm1-12* Mutanten ist die *FT*-Expression zu 50% der Expression des Wildtyps vorhanden. Eine starke Repression von *FT* in Rosettenblättern hätte zu einem spätblühenden Phänotyp unter Langtag-Bedingungen geführt, was bei *ibm1-*

12 Mutanten jedoch nicht der Fall ist. Insofern ist die Regulation von *FT* in Rosettenblättern von *ibm1* Mutanten im Einklang mit dem Blühzeitpunkt. Das moderat spätere Blühen von *ibm1* Mutanten könnte durch die verminderte *FT*-Expression in Rosettenblättern erklärt werden, da sich die *ft* Mutation semidominant auf den Blühzeitpunkt auswirkt (Kardailsky, I. et al. 1999). Analyse des Blühzeitpunkts von *ibm1-11 ft-13* Doppelmутanten und *ibm1-11 +/ft-13* Mutanten zeigen keinen additiven Effekt auf den Blühzeitpunkt von *IBM1* und *FT*, was auf ein *FT*-abhängiges moderates Spätblühen bei *ibm1* Mutanten hindeutet (Abbildung 3.19 D).

Konsequenterweise kann die Regulation von *FT* durch *IBM1* nur im Gewebe stattfinden, in dem beide Gene exprimiert sind. In allen Organen, in denen in *ibm1* Mutanten eine *FT*-Repression festzustellen ist, ist auch *IBM1* exprimiert, was die Analyse der *IBM1::IBM1-GUS* Expression belegt. In Rosettenblättern scheint die Expression von *IBM1::IBM1-GUS* auf die Vaskulatur begrenzt zu sein, während die Expression in Hochblättern auf der gesamten Blattfläche zu finden ist. In Blüten ist *IBM1::IBM1-GUS* vergleichbar mit *pFT::GUS* in Sepalen exprimiert. In Blütenstielen und Filamenten ist jedoch keine Expression von *IBM1::IBM1-GUS* zu finden, dafür in Antheren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das neue *ft-13* Allel isoliert, das eine erweiterte Funktion von *FT* nach der Blühinduktion offenbarte. Bei diesem Allel handelt es sich um eine durch T-DNA-Insertion im Intron herbeigeführte Unterbrechung der genomischen Sequenz im genetischen Hintergrund des Ökotyps Ws. *ft-13* Mutanten entwickeln florale Reversion. Das primäre IM entwickelt Blüten, nach denen zu Infloreszenzen transformierte Blüten produziert werden und Blüten mit Charakteristika von Infloreszenzen. Der Infloreszenzphänotyp von *ft-13* Mutanten ist mit *ibm1-12* Mutanten in Bezug auf dieses Phänotypmerkmal vergleichbar. Die detaillierte Charakterisierung des Phänotyps von *ft-13* Mutanten wurde von Dipl.-Biol. Maurice Wernado in seiner Diplomarbeit durchgeführt (Maurice Wernado 2011, Diplomarbeit). Im Rahmen seiner Arbeit konnte ferner mittels Kreuzung des *ft-10* Allels im Ökotyp Col mit der *cal-6* Mutante gezeigt werden, dass die *cal-6* Mutation den Infloreszenzphänotyp von *ft-10* verstärkt. *ft-10 cal-6* Doppelmутanten entwickelten florale Reversion im Ökotyp Col, was beweist, dass das intakte *CAL* im Ökotyp Col den Infloreszenzphänotyp von *ft-10* unterdrückt.

Es scheint möglich, dass eine konstitutive Expression von *FT* auch nach Erreichen der Blühinduktion notwendig ist, damit der Übergang zur Blütenentwicklung stabil bleibt. In anderen Pflanzenspezies entwickeln Mutanten von *FT*-Orthologen florale Reversion. In *Lycopersicon esculentum* (Tomate) sind bei Mutanten des *FT*-orthologen *SINGLE FLOWER TRUSS* Infloreszenzen zu finden, die nach erfolgter Blütenproduktion zur Entwicklung von vegetativen Spross-

sen zurückkehren (Molinero-Rosales, N. et al. 2004). Demnach könnte *FT* auch in *A. thaliana* nicht nur dazu beitragen, das vegetative Sprossapikalmeristem zum Infloreszenzmeristem zu transformieren, sondern auch für die Entwicklung von FM sorgen. Ein weiteres dafür sprechendes Argument ist das Ergebnis, dass in *ibm1* Mutanten *FT* und *AP1* reprimiert sind. Studien zu *ft ap1* Doppelmutanten hatten gezeigt, dass die Doppelmutanten Defekte in der Entwicklung von FM zeigen (Ruiz-Garcia, L. et al. 1997), die mit dem Phänotyp von *ap1 cal* Doppelmutanten unter Kurztag-Bedingungen vergleichbar sind (Bowman et al., 1993). Der Übergang zur Blütenentwicklung an der primären Infloreszenz ist bei *ft ap1* Doppelmutanten verspätet (Ruiz-Garcia, L. et al. 1997). Das primäre IM von *ft ap1* Doppelmutanten produziert im frühen Stadium der Blühinduktion nur sekundäre IM, was in einem mit *cauliflower* vergleichbaren Phänotyp resultiert. Der Phänotyp von *ibm1-12* Mutanten zeigt ebenfalls Aspekte des *ap1 cal* Phänotyps durch die Transformation von den an der primären Infloreszenz lateral entwickelten FM zu IM. Die Rolle von *FT* in seiner weiteren Funktion unterstreichen Studien von weiteren Mutantenkombinationen des Regulationsmechanismus der FMI. *ft lfy* Doppelmutanten entwickeln einen stärkeren Infloreszenzphänotyp als *lfy* Mutanten und *ap1 cal* Doppelmutanten (Ruiz-Garcia, L. et al. 1997). Letztere entwickeln immerhin späte Blüten, wohingegen bei *ft lfy* Doppelmutanten die primäre Infloreszenz durch das Fehlen von Blüten vegetativ wirkt.

Die gewebespezifische Regulation von *FT* durch *IBM1* impliziert, dass neben der weiteren Funktion von *FT* in der Entwicklung von FM auch die Expression in weiteren Gewebe (Hochblätter, Blüten) notwendig sein könnte. Studien zur Entwicklung von axillären Meristemen nach der Blühinduktion zeigen, dass *FT* auch für die Entwicklung von sekundären Infloreszenzen verantwortlich ist (Hiraoka, K. et al. 2013, Niwa, M. et al. 2013a, Niwa, M. et al. 2013b). Demnach soll das im Hochblatt exprimierte *FT* in das jeweilige axilläre Meristem transportiert werden, um dort für die Transformation zur Blütenbildung zu sorgen. Für die Entwicklung von axillären Meristemen scheint die *FT*-Expression in Infloreszenzen jedoch nicht notwendig zu sein (Hiraoka, K. et al. 2013). Es ist denkbar, dass das in Hochblättern exprimierte *FT* nicht nur in das axilläre Meristem sondern auch zum SAM transportiert wird und dort ebenfalls die Entwicklung von FM propagiert. Dafür spricht die starke Repression von *FT* sowie die ektopische DNA-Methylierung und H3K9me2 in Hochblättern von *ibm1* Mutanten.

4.1.5. Ein Modell von *FT* bei der Regulation der floralen Meristemidentität

Im hypothetischen Modell der Regulation von floraler Meristemidentität durch die Aktivierung von *FT* durch *IBM1* könnte die *FT*-Regulation in Infloreszenzen essentiell sein. Da keine florale Reversion beim Wildtyp (Ws) unter Kurztag-Bedingungen bekannt ist, unter denen *FT* in Roset-

tenblättern, Hochblättern und Sepalen reprimiert ist (Hiraoka, K. et al. 2013), müsste die *FT*-Expression in anderen Organen, in denen *FT* unabhängig von der Tageslänge exprimiert wird, in ausreichender Menge vorhanden sein. Studien zur Expression von *FT* unter Kurztag-Bedingungen zeigen, dass *FT* in Blütenstielen weiterhin exprimiert wird (Hiraoka, K. et al. 2013). In *ibm1* Mutanten, so zeigt der Microarray und die qRT-PCR-Analysen, ist *FT* in Infloreszenzen reprimiert. Jedoch lassen die Analysen keine Aussage über die Gewebe der Infloreszenz, in denen *FT* durch *IBM1* reguliert wird, zu. In Blütenstielen scheint *IBM::IBM-GUS* nur marginal exprimiert zu sein, während in Sepalen sowohl *IBM::IBM-GUS* als auch *pFT::GUS* exprimiert sind. In den Sepalen und Blütenstielen von *ibm1* Mutanten zeigt *pFT::GUS* ein mit dem Wildtyp vergleichbares Expressionsprofil.

Summa summarum zeigen die Analysen der *FT*-Regulation durch *IBM1*, dass *FT* in verschiedenen Organen von *ibm1* Mutanten reduziert ist. Die Ergebnisse lassen jedoch nicht auf den essentiellen Regulationsort (Hochblätter oder Infloreszenzen) von *FT* durch *IBM1* schließen, an dem die Expression von *FT* für die normale FM-Entwicklung ausreichend ist. Da *FT* für den Übergang zur Blütenentwicklung und deren Aufrechterhaltung in *A. thaliana* (Maurice Wernado, Diplomarbeit 2011) und in anderen Spezies (Molinero-Rosales, N. et al. 2004) verantwortlich ist, kann erwartet werden, dass dessen Reduktion in *ibm1-12* Mutanten den Infloreszenzphänotyp verursacht. Die Reduktion von *API* in *ibm1* Mutanten könnte indirekt zustandekommen, da *API* vom FT-FD-Proteinkomplex aktiviert wird. Dadurch könnte die Repression beider Gene und die Ausbildung des *ibm1*-Phänotyps, der Aspekte von *ft-13* Mutanten (de facto *ft cal* Doppelmutanten) und *ft ap1* Doppelmutanten zeigt, erklärt werden. Da die *cal* Mutation sowohl den *ft*- als auch den *ap1*-Phänotyp verstärkt und erst die *ft cal* (Maurice Wernado, Diplomarbeit 2011) und *ap1 cal* Doppelmutanten (Bowman, J. L. et al. 1993) transformierte FM entwickeln, legt die Verstärkung des *ibm1* Phänotyps durch die *cal* Mutation nahe, dass die Repression von *FT* und *API* in *ibm1* Mutanten für den Infloreszenzphänotyp von *ibm1* Mutanten verantwortlich ist und die florale Reversion, die bei *ft ap1* Doppelmutanten nicht beschrieben ist, durch das mutante *cal* Allel im Ökotyp Wassilewskija zustande kommt.

4.2. *IBM1* reguliert die *FT*-Expression durch Unterdrückung von CHG-DNA-Methylierung und H3K9me2 am *FT*-Promotor

IBM1 reguliert die DNA-Methylierung des CHG-Typs und H3K9me2 an hunderten von Genen in *A. thaliana* (Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Genetische Studien zu *IBM1* und *CMT3* und Studien des Epigenoms von deren Mutanten hatten gezeigt, dass die ektopische DNA-Methylierung in *ibm1* Mutanten durch die DNA-Methyltransferase-Aktivität von *CMT3* zustande kommt (Inagaki, S. et al. 2010). Die *cmt3* Mutation unterdrückt die ektopische DNA-Methylierung und H3K9me2 sowie alle phänotypischen Aspekte von *ibm1* Mutanten (Inagaki, S. et al. 2010, Saze, H. et al. 2008a). Der Infloreszenzphänotyp von *ibm1-12* Mutanten, so zeigt die phänotypische Analyse der in dieser Arbeit erzeugten *ibm1-12 cmt3* Doppelmutanten, wird durch die *cmt3* Mutation ebenfalls unterdrückt. Somit ist es offensichtlich, dass die *IBM1*-vermittelte Aufrechterhaltung der floralen Meristemidentität durch den selben Regulationsmechanismus, über die Unterdrückung der ektopischen CHG-Methylierung und H3K9me2, vollzogen wird.

Erwartungsgemäß, ausgehend vom gleichen Regulationsmechanismus, sollte die *FT*-Expression in *ibm1 cmt3* Doppelmutanten dereprimiert sein. Tatsächlich ergab die Analyse der *FT*-Expression in Hochblättern, dass *FT* in den Doppelmutanten dereprimiert ist. Dies deutet darauf hin, dass *FT* in Hochblättern durch die Unterdrückung der ektopischen CHG-Methylierung durch *IBM1* positiv reguliert wird. Dieses Ergebnis unterstützt das hypothetische Modell, nach dem die gewebespezifische Repression von *FT* in *ibm1* Mutanten für den Phänotyp verantwortlich ist, indem es eine Korrelation der Komplementation des Phänotyps in *ibm1 cmt3* Doppelmutanten mit der Wiederherstellung der *FT*-Expression liefert. Nach diesem Modell würde *FT* nach der Blühinduktion in den Hochblättern von *IBM1* aktiviert werden, um durch seinen Transport zum Sprossapikalmeristem die Entwicklung von FM aufrechtzuerhalten. *IBM1* würde in diesem Prozess *FT* durch Unterdrückung oder Entfernen der reprimierenden Histon- und DNA-Modifikationen aktivieren. Um diesem hypothetischen Modell eine entsprechende Grundlage zu verleihen, wurde der Chromatinzustand von *FT* in Hochblättern von *ibm1* Mutanten untersucht.

Genomweite Studien zur ektopischen DNA-Methylierung und H3K9me2 in *ibm1* Keimlingen zeigen keine Veränderung bei *FT* (Deleris, A. et al. 2012, Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Die Analyse der DNA-Methylierung am *FT*-Locus in Hochblättern von *ibm1* Mutanten sollte Aufschluss darüber liefern, ob es sich bei der gewebespezifischen Regulation von *FT* durch *IBM1* um eine direkte Aktivierung durch H3K9me2- und DNA-Demethylierung des

CHG-Typs handeln könnte. Da *pFT::GUS* in Hochblättern von *ibm1* Mutanten unterschiedlich exprimiert ist, liegt es nahe, dass der *FT*-Promotor von IBM1 reguliert wird. Phylogenetische Homologieanalysen und Komplementationsstudien mit Deletionskonstrukten führten zur Identifizierung von hoch konservierten und für die Transkription notwendigen DNA Bereichen in proximalen und distalen Regionen des *FT*-Promotors, die auf einer Länge von 5,7 kb ab dem Transkriptionsstart sequenzaufwärts verteilt sind (Adrian, J. et al. 2010). Die durch CO tageslängenvermittelte Aktivierung von *FT* benötigt die konservierten Regionen des *FT*-Promotors Block A und Block C. Demnach könnten reprimierende Modifikationen des Chromatins an diesen Regionen in *ibm1* Mutanten zur Reduktion der *FT*-Expression führen. Aus diesem Grund wurde die DNA-Methylierung am Promotor von *FT* untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden die *ibm1-5* Mutanten gewählt, da die *ibm1* Allele im Ökotyp Col gegenüber *ibm1* Allelen im Ökotyp Ws einen schwächeren morphologischen Phänotyp haben. Damit sollten möglichst sichergestellt werden, dass vergleichbare Gewebe vom Wildtyp und von *ibm1* Mutanten verwendet werden.

Die Analysen mit dem methylierungsabhängigen Restriktionsenzym McrBC deuten darauf hin, dass DNA-Methylierung bereits im Wildtyp an in Relation zum Transkriptionsstart proximalen und distalen Bereichen (-1,4 kb, -4,2 kb -5,9 kb) des *FT*-Promotors vorhanden und stärker als im transkribierten Bereich ausgeprägt ist (Abbildung 3.22). Jedoch konnten mittels McrBC-Restriktion der DNA keine Unterschiede zu *ibm1* Mutanten detektiert werden. Die DNA-Methylierungsanalyse durch Bisulfit-Sequenzierung am Block A zeigt ektopische DNA-Methylierung in *ibm1-5* Mutanten, die für den CHG-Typ spezifisch ist (Abbildung 3.24, Abbildung 3.25). Obwohl die meisten Cytosine in der DNA-Sequenz von Block A im CHH-Sequenzkontext vorliegen (Abbildung 3.25), ist in *ibm1* Mutanten ein hoher Anstieg an methylierten Cytosinen spezifisch an CHG-Positionen detektiert worden, das für *ibm1* Mutanten bei hunderten von Genen charakteristisch ist (Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Insofern unterstützt die ermittelte ektopische CHG-Methylierung am *FT*-Promotor in Hochblättern von *ibm1* Mutanten in Korrelation mit der Wiederherstellung der *FT*-Expression in *ibm1 cmt3* Mutanten im selben Gewebe das hypothetische Modell von *FT* bei der Regulation der floralen Meristemidentität, nach dem *FT* durch IBM1 aktiviert wird.

In vorangegangenen Arbeiten wurde bisher über ektopische CHG-Methylierung in *ibm1* Mutanten nur an transkribierten Genen berichtet, jedoch nicht an deren Promotoren und transkriptionsregulierenden Regionen (Inagaki, S. et al. 2010, Miura, A. et al. 2009). Es ist bislang auch nicht bekannt, ob die CHG-Methylierung an Genen für deren Reprimierung ausreichend ist, obwohl die CHG-Methylierung im Wildtyp zum großen Teil im transkriptionell inaktiven Heterochro-

matin und im Euchromatin an Transposons und repetitiven Elementen vorkommt und stets mit anderen Chromatin-Modifikationen wie H3K9me2 assoziiert ist (Bernatavichute, Y. V. et al. 2008). Globale Untersuchungen zu einer möglichen Korrelation zwischen ektopischer CHG-Methylierung an Genen, die in *ibm1* und *met1* Mutanten zu finden ist, und deren Expression ergaben, dass die betroffenen Gene in den Mutanten nicht zwingendermaßen reprimiert sind (Deleris, A. et al. 2012, Miura, A. et al. 2009). Einige der Gene, die in *ibm1* Mutanten ektopische CHG-Methylierung tragen, zeigen reduzierte Transkription, während andere unverändert oder gar hochreguliert sind (Miura, A. et al. 2009). Es bleibt daher spekulativ, ob allein die ektopische CHG-Methylierung und H3K9me2 in *ibm1* Mutanten für die Repression von IBM1-Zielgenen verantwortlich sind.

Ferner ist in *ibm1* Mutanten am Block A die CHH-Methylierung etwas erhöht. Die CHH-Methylierung wird durch den RdDM-Mechanismus etabliert und findet sich hauptsächlich im Heterochromatin und an repetitiven Sequenzen wieder. Expressionsstudien von *ibm1* Mutanten zur Identifizierung von direkten Zielgenen von *IBM1* hatten ergeben, dass die Komponenten des RdDM-Mechanismus *RDR2* und *DCL3*, die für die Produktion von siRNA notwendig sind, von *IBM1* positiv und direkt reguliert werden (Fan, D. et al. 2012). Daher teilen die Mutanten *rdr2* und *dcl3* mit *ibm1* Mutanten eine gemeinsame Schnittmenge von Genen, die in allen drei Mutanten hochreguliert sind (Fan, D. et al. 2012). Die schwache Erhöhung der CHH-Methylierung am *FT*-Promotor ist in *ibm1* Mutanten dadurch jedoch nicht zu erklären, weil durch die Reprimierung der siRNA-Produktion ein Verlust von DNA-Methylierung zu erwarten wäre. Der Methylierungszustand an den regulierten Loci ergibt sich aus einer dynamischen Interaktion zwischen DNA-Methyltransferasen und DNA-Demethylasen. In einer groß angelegten Expressionsstudie von *ibm1* Mutanten wurde gezeigt, dass *IBM1* die DNA-Demethylase *ROS1* positiv reguliert (Rigal, M. et al. 2012). In *ibm1* Mutanten ist *ROS1* im CHG-Kontext ektopisch methyliert und dessen Expression runterreguliert (Rigal, M. et al. 2012). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass einige aberante Methylierungsmuster in *ibm1* Mutanten indirekt durch den Funktionsverlust von *ROS1* zustande kommen könnten, wie diese beispielsweise am *FT*-Promotor in Form eines geringen Anstiegs der CHH-Methylierung auftreten.

Wenn der *FT*-Promotor das modulierende Element der *IBM1*-vermittelten *FT*-Aktivierung ist, würde man vor allem ektopische H3K9me2 am *FT*-Promotor in *ibm1* Mutanten erwarten. Zwar ist die Verteilung der ektopischen Methylierung in *ibm1* Mutanten stets an den Transkriptionseinheiten von moderat exprimierten Genen ausgemacht worden, wobei die größte Anreicherung von der CHG-Methylierung und H3K9me2 in der Mitte von Genen zu finden ist, während der

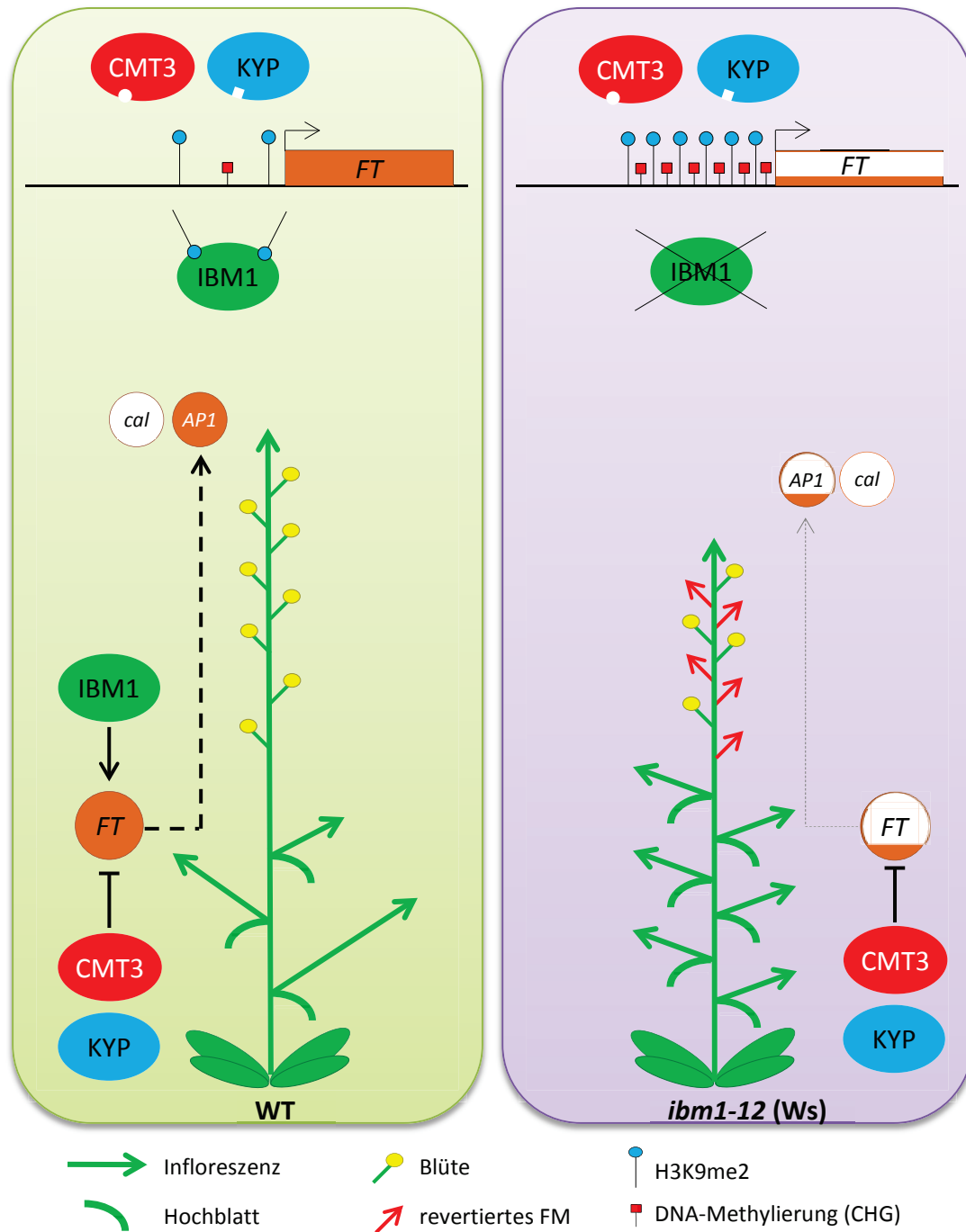


Abbildung 4.1: Modell zur Funktion von IBM1 bei der Regulation der floralen Meristemidentität.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und publizierten Daten, wurde ein Modell zur Funktion von IBM1 bei der Regulation der floralen Meristemidentität durch Aktivierung von *FT* entwickelt. Nach diesem Modell wird die Blühinduktion Tageslänge-abhängig und größtenteils *IBM1*-unabhängig initiiert. In den Primordien sowie in den entwickelten Hochblättern und/oder Blüten unterdrückt IBM1 ektopische H3K9me2 am *FT*-Locus, das FT-Protein wird exprimiert und zum Sprossapikalmeristem transportiert, an dem es *AP1* und damit die Entwicklung von floralen Meristemen initiiert. In *ibm1-12* Mutanten ist *FT* nach der Blühinduktion in Hochblättern und/oder Blüten durch KYP und CMT3 reprimiert, die H3K9me2 und CHG-Methylierung am *FT*-Locus propagieren. Die Repression von *FT* führt zur verminderten Expression von *AP1* an Blütenprimordien im Sprossapikalmeristem. Die natürliche *cal* Mutation im Wildtyp des Ökotyps Ws verstärkt den Effekt, die angelegten floralen Meristeme revertieren zu Infloreszenzmeristemen.

Methylierungsgrad zu 5'- und 3'-Enden hin abfällt. Jedoch haben die Promotorfusionsstudien in *ibm1* Mutanten mit dem GUS-Reporterprotein gezeigt, dass die Regulation von *FT* in Hochblättern am Promotor von *FT* stattfindet. Frühere Analysen von Chromatin-Modifikationen am *FT*-Locus hatten gezeigt, dass eine geringe Anreicherung von H3K9me2 in Rosettenblättern im Wildtyp vorhanden ist (Farrona, S. et al. 2011). Tatsächlich wurde in dieser Arbeit mittels ChIP mit einem Antikörper für H3K9me2 an allen drei Testregionen des *FT*-Locus H3K9me2 im Wildtyp detektiert, das gegenüber der Negativkontrolle deutlich angereichert ist (Abbildung 5.2). An allen drei Testregionen inklusive Block A ist auch eine Anreicherung von H3K9me2 in *ibm1-5* Mutanten gegenüber dem Wildtyp festzustellen (Abbildung 3.27). Somit ist die ermittelte ektopische H3K9me2 mit der CHG-Methylierung am Block A kolokalisiert, wie dies an hunderten von Genen in *ibm1* Mutanten veröffentlicht ist (Inagaki, S. et al. 2010). Die ektopische H3K9me2 war jedoch nur in *ibm1-5* Mutanten zweiter homozygoter Generation detektierbar. Dagegen wurde die ektopische DNA-Methylierung am *FT*-Promotor in dieser Arbeit bereits bei *ibm1-5* Mutanten erster homozygoter Generation gezeigt. Tatsächlich wurden in anderen Arbeiten auch *ibm1* Mutanten zweiter homozygoter Generation verwendet, um sowohl ektopische H3K9me2 mittels ChIP als auch DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Sequenzierung am Locus *BNS* zu detektieren (Saze, H. et al. 2008a). Es ist anzunehmen, dass die ektopische CHG-Methylierung bei *ibm1* Mutanten von Generation zu Generation angereichert wird, wie dies auch für H3K9me2 offensichtlich der Fall ist. Zumal IBM1 eine Histon-Demethylase ist, ist es ferner anzunehmen, dass bereits in der ersten homozygoten Generation von *ibm1-5* Mutanten ektopische H3K9me2 am *FT*-Locus vorhanden ist, die jedoch experimentell bedingt unter der Detektionsgrenze der ChIP liegt. Dagegen ist Bisulfit-Sequenzierung eine auf der Sequenzierung der DNA basierende Methode mit niedrigerer Detektionsgrenze.

Die heterochromatischen Chromatin-Modifikationen am *FT*-Promotor könnten die Affinität des Transkriptionskomplexes zur DNA verringern und damit die Expression erheblich beeinflussen. Zumal ektopische H3K9me2 an zwei untersuchten Promotorregionen sowie in der transkribierten Sequenz von *FT* detektiert wurde, ist es denkbar, dass die Regulation von *FT* durch *IBM1* nicht ausschließlich am Block A stattfindet. Es ist vorstellbar, dass *IBM1* sowohl am *FT*-Promotor als auch an der transkribierten Sequenz den Chromatinzustand und die Expression reguliert. Die Demethylierung am Gen könnte für die Aufrechterhaltung des dekondensierten Zustands notwendig sein, indem dadurch der Transkriptionsmaschinerie die Passage sichergestellt wird. In Anbetracht des 5,7 kb langen *FT*-Promotors, ist es denkbar, dass die Funktion von *IBM1* notwendig ist, um durch Entfernen von heterochromatischen Modifikationen die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren zu den verschiedenen Regulationseinheiten sicherzustellen. Jedoch ist zurzeit unklar, welches Element in diesem Regulationsmechanismus das Rekrutie-

runungssignal von *KYP* oder *CMT3* zum *FT*-Locus darstellt, das zur Komplettierung des Modells der Regulation von *FT* durch H3K9me2 fehlt.

5. Anhang

5.1. Kontrollen des α H3K9me2-ChIP

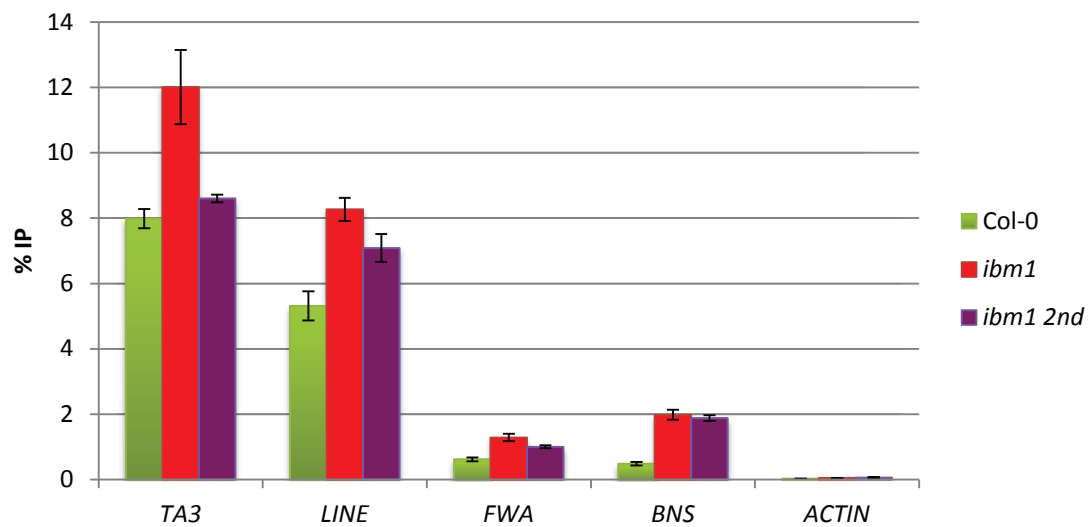


Abbildung 5.1: Qualitätskontrolle des α H3K9me2-ChIP.

Quantitative PCR der mit H3K9me2-Antikörpern präzipitierten DNA von 5 Kontroll-Loci. H3K9me2 ist in transposablen Elementen *TA3* und *LINE* stark angereichert, moderate Anreicherung in *FWA* und *BNS*, keine Anreicherung im Kontroll-Gen *ACTIN*. Die Daten sind auf den jeweiligen Input normalisiert und bilden für jeden untersuchten Genotyp das Mittel von drei technischen Replikaten. (*ibm1 2nd* = *ibm1* Mutanten zweiter homozygoten Generation.)

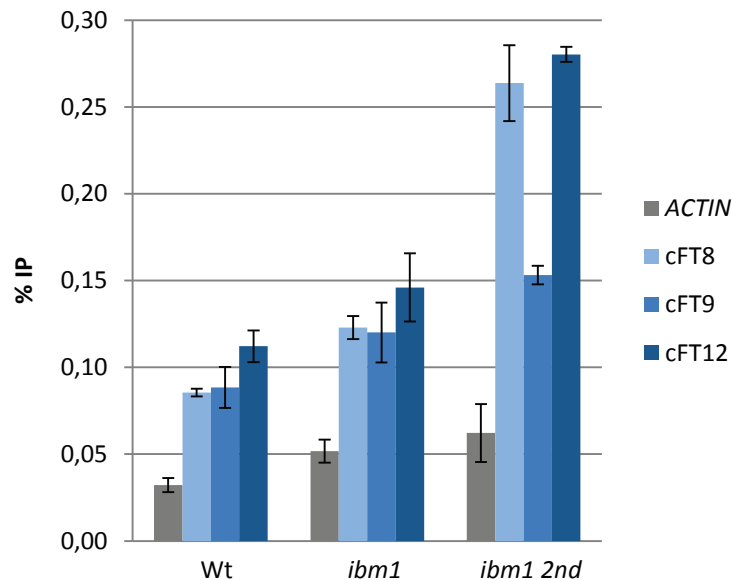


Abbildung 5.2 ChIP mit H3K9me2-Antikörpern von Hochblättern des Wildtyps und der *ibm1* Mutanten erster und zweiter homozygoten Generationen.

Die drei untersuchten Positionen des *FT*-Locus tragen die H3K9me2-Modifikation. Die Präzipitation von *ACTIN*, welches kein H3K9me2 trägt, wurde bestimmt zur Ermittlung des nicht-spezifischen Hintergrunds. Die präzipitierte DNA wurde mittels quantitativer PCR ermittelt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an, der sich aus dem Mittel von drei technischen Replikaten ergibt. Die IP ist normalisiert auf den jeweiligen Input. (*ibm1 2nd* = *ibm1* Mutanten zweiter homozygoten Generation.)

5.2. *ibm1*-Microarray

Liste von allen Genen aus dem Microarray, die in *ibm1* um mindestens Faktor zwei hoch- oder runterreguliert sind (vgl. Abb. 3.13; „up“ = in *ibm1* reprimiert, „down“ = in *ibm1* hochreguliert)

799,6	up	AT5G07530	24,1	up	AT2G11530	11,8	up	AT1G75920
383,6	up	AT5G07550	23,5	up	AT3G18590	11,7	up	AT1G27280
345,6	up	AT2G06002	23,2	up	AT4G27420	11,6	up	AT1G18520
280,7	up	AT1G75940	23,1	up	AT1G15330	11,4	up	AT3G15400
185,7	up	AT5G07560	22,2	up	AT3G07610	11,2	up	AT1G36530
183,8	up	AT5G07550	22,1	up	AT3G58260	11,2	up	AT2G20670
168,4	up	AT1G06260	22,1	up	AT2G28850	11,2	up	AT1G18960
129,1	up	AT1G68875	21,6	up	AT2G32460	11,0	up	AT3G47340
109,4	up	AT1G20130	21,6	up	AT3G50580	10,9	up	AT2G05540
98,2	up	AT1G75910	21,3	up	AT1G06990	10,9	up	AT4G08670
96,6	up	AT1G74550	20,9	up	AT1G15330	10,8	up	AT1G62940
93,0	up	AT1G75930	20,8	up	AT2G28680	10,8	up	AT3G47340
83,1	up	AT2G46880	20,7	up	AT1G61110	10,6	up	AT1G11510
82,3	up	AT5G55690	20,0	up	AT4G33355	10,6	up	AT5G04400
77,6	up	AT5G07530	19,5	up	AT5G28470	10,6	up	NP454092
75,4	up	AT1G74540	19,3	up	AT5G16920	10,5	up	AT5G56110
71,7	up	AT1G07340	19,1	up	NP163233	10,4	up	AT5G51790
71,2	up	AT1G01280	18,6	up	AT2G31480	10,3	up	AT2G29770
63,9	up	AT1G75910	18,4	up	AT1G32030	10,3	up	AT5G55880
62,6	up	AT4G36350	18,3	up	AT2G46880	10,2	up	AT1G61820
60,8	up	AT5G55690	18,3	up	AT1G65342	10,2	up	AT1G18960
59,6	up	AT1G06280	17,8	up	TA29648_3702	10,1	up	AT2G05540
59,5	up	AT3G23770	17,8	up	AT1G15385	10,0	up	TC308879
56,9	up	AT1G61110	17,5	up	AT2G39590	10,0	up	AT3G15400
55,1	up	AT1G20132	17,0	up	AT2G29600	10,0	up	AT2G17940
54,0	up	AT2G18420	17,0	up	AT1G25330	9,9	up	AT2G29780
51,4	up	AT3G22640	16,8	up	AT1G65480	9,9	up	AT4G15700
49,0	up	AT3G51590	16,8	up	AT4G29250	9,9	up	AT1G20120
46,5	up	AT1G26720	16,3	up	AT5G07520	9,8	up	AT1G21360
45,5	up	AT3G11980	16,2	up	AT4G35770	9,8	up	AT4G05310
43,8	up	AT5G07540	15,7	up	AT3G59510	9,7	up	AT2G33705
43,5	up	AT2G36190	15,6	up	AT1G66850	9,6	up	AT3G06545
42,7	up	AT3G25050	15,5	up	AT5G60090	9,6	up	AT4G20050
42,5	up	AT5G07560	15,5	up	AT1G75250	9,5	up	AT1G60240
40,3	up	AT4G12920	15,0	up	AT1G18280	9,5	up	TA28705_3702
39,8	up	AT1G56360	14,8	up	AT4G15680	9,4	up	AT5G09750
39,7	up	AT1G75930	14,8	up	AT5G07600	9,3	up	AT4G30030
36,2	up	AT2G42940	14,7	up	AT4G09450	9,3	up	AT1G66534
36,0	up	AT5G43340	14,5	up	AT5G44950	9,3	up	AT4G03505
34,7	up	AT2G03850	14,3	up	AT3G42960	9,3	up	AT5G45820
34,4	up	AT3G07610	14,0	up	AT1G27050	9,3	up	AT5G60500
33,9	up	AT5G17340	13,9	up	AT3G10580	9,2	up	AT1G17710
33,7	up	TA53001_3702	13,8	up	AT4G14080	9,2	up	AT2G20825
31,9	up	AT1G13150	13,8	up	AT5G48210	9,1	up	AT2G32150
31,6	up	AT1G44224	13,6	up	AT1G75920	9,1	up	AT2G34600
31,5	up	TA29941_3702	13,2	up	AT5G55680	9,1	up	AT3G09385
31,5	up	AT1G15460	12,8	up	AT3G47340	9,1	up	AT1G56030
28,6	up	AT3G07610	12,8	up	AT3G26140	9,1	up	AT1G49330
28,4	up	AT1G67990	12,7	up	AT5G53510	8,9	up	AT2G35090
28,3	up	AT1G23570	12,5	up	AT4G34850	8,8	up	AT3G23130
28,0	up	AT1G78440	12,3	up	AT3G57960	8,8	up	AT3G13220
27,8	up	AT1G65480	12,2	up	AT1G50350	8,8	up	AT1G20130
27,2	up	AT2G23800	12,1	up	AT5G40260	8,8	up	AT1G11070
27,0	up	AT4G09960	12,1	up	BP842513	8,7	up	AT3G54990
26,8	up	AT1G08065	12,1	up	AT4G35837	8,5	up	AT2G37030
26,4	up	AT4G33355	12,1	up	AT1G24230	8,4	up	AT5G47740
24,6	up	AT5G49070	12,0	up	AT3G22920	8,4	up	AT3G12850
24,4	up	AT4G14815	12,0	up	AT2G29820	8,4	up	AT5G59810
24,2	up	AT4G35770	12,0	up	TA29937_3702	8,4	up	AT3G23140
24,1	up	TA29936_3702	11,9	up	AT5G60080	8,3	up	AT2G33830

5. Anhang

8,3	up	AT3G22830	6,4	up	AT5G20250	5,4	up	AT1G56680
8,3	up	AT5G17200	6,4	up	AT5G03860	5,4	up	AT1G28330
8,3	up	AT3G18827	6,4	up	AT1G12080	5,4	up	AT3G27440
8,3	up	AT1G69500	6,4	up	AT1G61590	5,4	up	AT5G52490
8,2	up	AT2G04622	6,4	up	AT5G03000	5,4	up	AT2G20880
8,2	up	AT5G40260	6,4	up	AT1G10070	5,4	up	DR355517
8,2	up	NP207828	6,4	up	AT4G37860	5,4	up	AT5G45830
8,2	up	BP667596	6,3	up	AT5G01610	5,4	up	AT5G58360
8,2	up	AT4G37220	6,3	up	AT1G62975	5,3	up	AT3G26125
8,1	up	AT3G21910	6,3	up	AT5G38710	5,3	up	AT2G15770
8,1	up	AT3G62950	6,3	up	AT5G10946	5,3	up	AT5G53190
8,1	up	AT5G50060	6,3	up	AT2G23945	5,3	up	AT1G65140
8,0	up	AT1G21866	6,3	up	BU917423	5,3	up	AT4G14805
8,0	up	AT4G28110	6,2	up	AT2G31460	5,3	up	AT1G36150
8,0	up	AT3G58280	6,2	up	AT4G05260	5,3	up	AT3G21460
7,9	up	TA47233_3702	6,2	up	TA32094_3702	5,2	up	AT5G38230
7,9	up	AT3G15440	6,2	up	AT5G16090	5,2	up	AT3G13450
7,9	up	AT3G48390	6,2	up	AT4G03723	5,2	up	AT5G55590
7,9	up	AT2G34100	6,2	up	AT3G57970	5,2	up	AT5G45830
7,8	up	AT2G42480	6,2	up	AT2G29280	5,2	up	AT2G24280
7,8	up	AT4G37050	6,2	up	AT2G42885	5,1	up	AT1G76470
7,8	up	AT2G29780	6,1	up	AT3G15450	5,1	up	AT2G33830
7,6	up	AT1G27080	6,1	up	AT5G47635	5,1	up	AT3G04960
7,6	up	AT1G61820	6,1	up	AT1G54240	5,1	up	AT1G20320
7,6	up	AT5G14300	6,1	up	AT3G03540	5,1	up	AT1G73190
7,6	up	AT1G71160	6,1	up	AT4G10507	5,1	up	AT1G80550
7,5	up	AT1G60240	6,1	up	AT4G12930	5,1	up	AT1G75490
7,5	up	AT1G53270	6,0	up	AT2G17880	5,1	up	AT1G64030
7,5	up	AT3G58340	6,0	up	AT1G67110	5,1	up	AT2G42140
7,5	up	AT5G56970	6,0	up	AT2G42830	5,1	up	AT1G19640
7,5	up	AT1G21540	6,0	up	AT2G20970	5,1	up	AT2G18115
7,5	up	AT1G05330	6,0	up	AT1G76470	5,1	up	AT4G33390
7,4	up	AT5G60140	6,0	up	AT5G28073	5,1	up	AT1G62975
7,4	up	AT4G14130	5,9	up	AT3G16070	5,0	up	AT1G11080
7,4	up	AT4G14130	5,9	up	AT1G74220	5,0	up	TA44139_3702
7,4	up	AT4G15690	5,9	up	AT5G50790	5,0	up	AT5G39910
7,3	up	AT2G33830	5,9	up	AT3G26510	5,0	up	AT1G54230
7,3	up	AT1G02610	5,9	up	AT1G47920	5,0	up	AT4G10120
7,3	up	AT5G63770	5,9	up	AT3G26125	5,0	up	AT5G39180
7,3	up	AT1G34230	5,9	up	AT1G28330	5,0	up	AT5G62280
7,3	up	AT5G36910	5,9	up	AT5G28237	5,0	up	AT3G26610
7,3	up	AT4G33900	5,9	up	AT2G20700	4,9	up	AT4G16160
7,3	up	AT1G60570	5,9	up	TA29020_3702	4,9	up	AT5G62360
7,3	up	CB260249	5,8	up	AT5G56570	4,9	up	AT1G44191
7,2	up	AT1G26710	5,8	up	AV817990	4,9	up	AT5G18330
7,2	up	AT3G50450	5,8	up	TA30264_3702	4,9	up	AT3G58390
7,1	up	AT3G12540	5,8	up	BP656597	4,9	up	AT3G43710
7,1	up	AK230421	5,7	up	DR380751	4,9	up	AT2G23060
7,1	up	AT1G20132	5,7	up	TA33540_3702	4,9	up	AT1G20925
7,1	up	AT5G17810	5,7	up	AT2G30600	4,9	up	AT1G11920
7,1	up	AT1G19394	5,7	up	AT5G20250	4,9	up	AT2G03170
7,1	up	AT4G15670	5,7	up	AT1G15380	4,9	up	AT5G61110
7,1	up	AT2G17170	5,7	up	BX816951	4,8	up	AT1G61820
7,0	up	AT1G66060	5,7	up	AT4G22233	4,8	up	AT5G40940
7,0	up	AT5G24790	5,7	up	AT3G15450	4,8	up	AT5G56550
6,9	up	AT3G62725	5,6	up	AT3G29798	4,8	up	AT1G55546
6,9	up	AT5G56400	5,6	up	AT1G30814	4,8	up	TA27785_3702
6,9	up	AT4G26280	5,6	up	AT2G34370	4,8	up	AT5G22920
6,7	up	AT4G37610	5,6	up	AT5G63560	4,8	up	AT3G07250
6,7	up	AT3G14950	5,5	up	AT5G51810	4,8	up	AT1G28500
6,7	up	AT4G22080	5,5	up	AT3G21590	4,8	up	AT2G29830
6,7	up	AT1G22015	5,5	up	AT1G50830	4,8	up	AT5G20250
6,7	up	AT5G33355	5,5	up	AT4G12940	4,8	up	AT5G49920
6,6	up	AT1G32180	5,5	up	AT3G12540	4,8	up	AT5G04770
6,6	up	AT3G57370	5,5	up	AT5G61350	4,8	up	AT5G65970
6,6	up	AT1G50750	5,5	up	AT3G21720	4,7	up	AT2G33830
6,5	up	AT3G11110	5,4	up	AT5G58784	4,7	up	AT1G67810
6,5	up	AT3G23130	5,4	up	AT2G42830	4,7	up	AT1G24260
6,5	up	AT3G56220	5,4	up	AT1G24260	4,7	up	AT5G46795

5. Anhang

4,7	up	AT2G16260	4,2	up	AT4G11430	3,8	up	AT1G06980
4,7	up	AT1G78400	4,2	up	AT1G02050	3,8	up	AT1G53163
4,7	up	AT5G22920	4,2	up	AT1G20480	3,8	up	AT3G15630
4,7	up	AT2G36180	4,2	up	AT3G44760	3,8	up	AT1G07795
4,7	up	AT5G21170	4,2	up	AT5G17300	3,8	up	AT3G29370
4,7	up	AT1G17540	4,2	up	AT5G02660	3,8	up	AT2G38400
4,7	up	R65132	4,2	up	AT3G04960	3,8	up	AT1G21970
4,7	up	AI992956	4,1	up	TA29990_3702	3,8	up	AT4G20100
4,7	up	AT3G06560	4,1	up	AT5G56870	3,8	up	DR339811
4,7	up	TA25819_3702	4,1	up	AT2G37950	3,8	up	AT1G12780
4,6	up	AT3G06100	4,1	up	AT4G04690	3,8	up	AT1G12780
4,6	up	NP965856	4,1	up	AT1G34100	3,8	up	AT3G23880
4,6	up	AT1G20790	4,1	up	AT3G46300	3,8	up	AT1G02340
4,6	up	AT3G10116	4,1	up	AT5G46874	3,8	up	AT3G26390
4,6	up	TA49640_3702	4,1	up	T43643	3,8	up	AT4G27590
4,6	up	AT1G03090	4,1	up	AT5G44540	3,8	up	AT2G44800
4,6	up	AT1G24600	4,1	up	AT2G03460	3,8	up	AT3G48450
4,5	up	AT1G71030	4,1	up	AT2G39510	3,8	up	AI999739
4,5	up	AT1G69120	4,1	up	AT3G47210	3,8	up	AT1G15360
4,5	up	AT5G39150	4,1	up	AT3G30530	3,8	up	AT3G15450
4,5	up	AT5G35110	4,1	up	AT1G18330	3,8	up	AT2G34700
4,5	up	AT1G63340	4,1	up	AT1G02050	3,8	up	AT5G11412
4,5	up	AT1G23510	4,1	up	AT1G80440	3,7	up	TC298115
4,5	up	AT1G16510	4,1	up	AT5G09220	3,7	up	AT1G75790
4,5	up	AT3G25930	4,0	up	AT2G16910	3,7	up	AT5G05890
4,5	up	AT5G05530	4,0	up	AT2G01520	3,7	up	AT1G28700
4,5	up	AT4G08800	4,0	up	AT2G22460	3,7	up	AT1G12780
4,5	up	AT3G54510	4,0	up	AT2G34010	3,7	up	AT5G39010
4,5	up	AT1G12040	4,0	up	AT1G19640	3,7	up	AT3G50570
4,5	up	AT1G67670	4,0	up	AT1G10682	3,7	up	AT1G73050
4,4	up	DR368472	4,0	up	AT5G56870	3,7	up	AT2G43670
4,4	up	AT5G21170	4,0	up	AT5G18840	3,7	up	NP221919
4,4	up	AT1G80920	4,0	up	AT3G02310	3,7	up	AT2G22980
4,4	up	AT1G80920	4,0	up	AT4G36570	3,7	up	AT3G57520
4,4	up	AT2G34555	4,0	up	AT1G53885	3,7	up	TA53181_3702
4,4	up	AT1G28330	4,0	up	AT5G20370	3,7	up	AT1G77215
4,4	up	AT4G27330	4,0	up	AT4G30050	3,7	up	AT5G15800
4,4	up	AT3G49030	4,0	up	AT1G78640	3,7	up	AT5G14010
4,4	up	BE039144	4,0	up	AT3G42800	3,7	up	AT3G18773
4,4	up	AT5G60408	4,0	up	AT1G54540	3,7	up	AT1G62270
4,4	up	AT2G34430	4,0	up	TA49574_3702	3,7	up	BX817525
4,4	up	AT5G14070	3,9	up	AT3G22750	3,7	up	AT1G09480
4,4	up	AT2G35730	3,9	up	AT5G59230	3,7	up	TC299241
4,4	up	AT2G26940	3,9	up	AT1G75450	3,7	up	AT1G77932
4,4	up	AT1G24220	3,9	up	AT2G01960	3,7	up	AT3G08750
4,4	up	AT1G33055	3,9	up	AT1G13245	3,7	up	AT3G19350
4,4	up	AT3G03450	3,9	up	AT1G10140	3,7	up	AT4G18960
4,3	up	AT5G54585	3,9	up	AT5G15800	3,7	up	AT2G33830
4,3	up	AT5G44417	3,9	up	AT5G55700	3,7	up	AV543237
4,3	up	AT4G24050	3,9	up	AT1G49500	3,7	up	TA32540_3702
4,3	up	AT2G05300	3,9	up	AT5G07410	3,6	up	AT5G12270
4,3	up	AT1G19960	3,9	up	AT4G22090	3,6	up	AT2G12420
4,3	up	AT2G47120	3,9	up	AT5G21940	3,6	up	AT3G51190
4,3	up	AT1G61050	3,9	up	AT1G52342	3,6	up	TA33422_3702
4,3	up	AT5G09730	3,9	up	AT2G26695	3,6	up	AT4G10260
4,3	up	AT1G79700	3,9	up	AT5G20240	3,6	up	AT1G67481
4,3	up	AT1G22990	3,9	up	AT2G39570	3,6	up	AT2G15770
4,3	up	AT1G54740	3,9	up	AT5G55370	3,6	up	TA31141_3702
4,3	up	AT3G46770	3,9	up	AT1G07860	3,6	up	AT3G61260
4,3	up	AT3G03450	3,9	up	AU226523	3,6	up	AT5G10250
4,3	up	AT5G17300	3,9	up	AT2G25900	3,6	up	AT3G61028
4,3	up	AT3G23360	3,9	up	AT3G20557	3,6	up	AT3G55500
4,3	up	AT5G62360	3,9	up	AT1G50770	3,6	up	AT2G22980
4,2	up	AT4G37150	3,9	up	AT5G12270	3,5	up	AT1G27860
4,2	up	AT5G12280	3,9	up	AT5G59845	3,5	up	AT4G24140
4,2	up	AT3G22231	3,9	up	AT5G13170	3,5	up	AT4G18960
4,2	up	AT5G13130	3,8	up	AT2G39510	3,5	up	AT1G79780
4,2	up	TA47612_3702	3,8	up	NP452751	3,5	up	AT5G52160
4,2	up	TA42683_3702	3,8	up	AT1G14420	3,5	up	BP620544

5. Anhang

3,5	up	AT1G18120	3,3	up	TA30023_3702	3,0	up	AT5G22430
3,5	up	AT1G10010	3,3	up	AT3G52080	3,0	up	CD533709
3,5	up	AT4G32480	3,3	up	AT5G14690	3,0	up	AT3G02620
3,5	up	AT5G07510	3,3	up	AT1G45063	3,0	up	AT3G26510
3,5	up	AT5G41080	3,3	up	TA30818_3702	3,0	up	AT1G70690
3,5	up	AT3G05150	3,3	up	AT2G02780	3,0	up	AT5G18340
3,5	up	AT3G58250	3,3	up	AT5G28230	3,0	up	AT1G66340
3,5	up	AT3G50560	3,3	up	AT5G21940	3,0	up	AT3G06640
3,5	up	AT1G12780	3,2	up	AT3G24280	3,0	up	AT5G62360
3,5	up	AT3G55090	3,2	up	AT2G45685	3,0	up	AT2G19110
3,5	up	AT1G45100	3,2	up	BP848451	3,0	up	AT4G04692
3,5	up	AT1G27710	3,2	up	AT4G36820	3,0	up	AT4G36040
3,5	up	AT5G02600	3,2	up	AT3G53420	3,0	up	AT1G36395
3,5	up	AT5G27900	3,2	up	AT2G15020	3,0	up	AT1G12070
3,5	up	AT5G57655	3,2	up	AT5G02020	3,0	up	AT5G42630
3,5	up	AT3G16300	3,2	up	AT5G18020	3,0	up	AT1G06570
3,4	up	AT5G06980	3,2	up	AT2G27500	3,0	up	AT2G18130
3,4	up	AT4G32480	3,2	up	AT3G62040	3,0	up	AT3G52055
3,4	up	AT4G20900	3,2	up	AT1G31310	3,0	up	AT4G16008
3,4	up	EG527418	3,2	up	AT996236	3,0	up	BP867645
3,4	up	AT3G48740	3,2	up	AT1G16910	3,0	up	AT4G01330
3,4	up	AT1G57980	3,2	up	AT3G42850	3,0	up	AT1G67290
3,4	up	AT3G24065	3,2	up	AT5G55970	3,0	up	AT4G03510
3,4	up	NP174002	3,2	up	AT5G62080	3,0	up	AT5G57400
3,4	up	AT5G40980	3,2	up	AT1G14760	3,0	up	AT1G19660
3,4	up	Z26667	3,2	up	AT1G17620	3,0	up	AT3G59530
3,4	up	AT3G15630	3,2	up	AT1G26310	3,0	up	AT2G30540
3,4	up	AT3G49150	3,2	up	AT5G53200	3,0	up	AT5G10970
3,4	up	AT4G36040	3,2	up	TC309688	3,0	up	AT4G03510
3,4	up	AT5G44440	3,2	up	AT1G33430	3,0	up	AT3G54500
3,4	up	AT5G65970	3,2	up	AT3G52130	3,0	up	AT1G76410
3,4	up	AT1G28330	3,2	up	AT5G19120	3,0	up	AT4G27260
3,4	up	TC286372	3,2	up	AT2G42730	3,0	up	TA46300_3702
3,4	up	AT1G69180	3,2	up	TA30874_3702	3,0	up	AT2G01960
3,4	up	AT2G27880	3,2	up	AT5G17810	3,0	up	DQ108714
3,4	up	AT4G35420	3,1	up	TA45892_3702	3,0	up	AT1G14860
3,4	up	AT3G54340	3,1	up	AT4G18980	2,9	up	AT5G16410
3,4	up	AT2G32310	3,1	up	AT3G24020	2,9	up	DR348682
3,4	up	AT1G15320	3,1	up	T43147	2,9	up	AT1G62270
3,4	up	AT5G36150	3,1	up	AT3G05900	2,9	up	AT1G63910
3,4	up	AT2G17036	3,1	up	AT3G13750	2,9	up	AT2G20870
3,4	up	AT4G04460	3,1	up	AT1G68110	2,9	up	AT2G39855
3,4	up	AT5G62080	3,1	up	AT5G62360	2,9	up	AT5G23260
3,4	up	AT3G10150	3,1	up	AT5G39890	2,9	up	AT5G06839
3,4	up	AT2G42180	3,1	up	AT5G06070	2,9	up	AT4G01820
3,4	up	AT1G02620	3,1	up	AT1G18120	2,9	up	AT5G55970
3,4	up	AT1G13700	3,1	up	AT3G53420	2,9	up	BP608087
3,3	up	AT1G80440	3,1	up	AT3G02500	2,9	up	AT2G02710
3,3	up	AT5G38620	3,1	up	AT5G02840	2,9	up	AT5G65790
3,3	up	AT1G78960	3,1	up	AT4G37900	2,9	up	AT2G35070
3,3	up	AT3G50330	3,1	up	AT4G24230	2,9	up	TC302551
3,3	up	AT1G49320	3,1	up	AT3G57770	2,9	up	AT3G62750
3,3	up	AT1G43640	3,1	up	AT4G03510	2,9	up	AT3G22800
3,3	up	AT5G14470	3,1	up	AT5G61320	2,9	up	AT4G02950
3,3	up	AT1G68440	3,1	up	AT4G24230	2,9	up	AT5G04120
3,3	up	AT4G12690	3,1	up	TA27913_3702	2,9	up	AT3G22090
3,3	up	AT5G66690	3,1	up	AT1G31350	2,9	up	AT2G25900
3,3	up	AT4G27450	3,1	up	AT2G40000	2,9	up	AT1G02660
3,3	up	AT2G27920	3,1	up	TA27461_3702	2,9	up	AT3G16540
3,3	up	DQ108843	3,1	up	AT3G61260	2,9	up	AT4G33150
3,3	up	AT5G39750	3,1	up	BX813389	2,9	up	AT4G13700
3,3	up	AT2G25900	3,1	up	TA26531_3702	2,9	up	TA51452_3702
3,3	up	AT1G69110	3,1	up	AT5G47720	2,9	up	AT5G23235
3,3	up	AT4G20050	3,1	up	AT2G27630	2,9	up	AT3G53420
3,3	up	AT2G40000	3,1	up	AT3G53640	2,9	up	AT1G12440
3,3	up	AT3G10430	3,1	up	DR750552	2,9	up	AT1G49032
3,3	up	AT4G38390	3,0	up	AT3G53420	2,9	up	AT3G61060
3,3	up	AT3G61060	3,0	up	TC282719	2,9	up	AT5G41380
3,3	up	AT4G10910	3,0	up	AT3G62860	2,9	up	AT5G38200

5. Anhang

2,9	up	AT4G34550	2,7	up	AT3G21710	2,6	up	AT1G67710
2,9	up	AT1G18270	2,7	up	AT3G60940	2,6	up	AT4G05505
2,9	up	AT3G15450	2,7	up	AT3G29575	2,6	up	AT1G02040
2,8	up	TA33712_3702	2,7	up	AT3G59940	2,6	up	AT3G05150
2,8	up	AT5G66052	2,7	up	AT4G27260	2,6	up	AT2G46670
2,8	up	AT5G05810	2,7	up	TA38983_3702	2,6	up	TA34454_3702
2,8	up	AT3G56230	2,7	up	AT3G26510	2,6	up	AT1G36070
2,8	up	AT3G53420	2,7	up	AT5G50950	2,6	up	AT5G16110
2,8	up	AT2G13360	2,7	up	AT5G02160	2,6	up	AV565572
2,8	up	AT2G13360	2,7	up	AT1G11400	2,6	up	TA27909_3702
2,8	up	H36698	2,7	up	AT5G14510	2,6	up	AT1G32780
2,8	up	AT1G04540	2,7	up	AT3G07310	2,6	up	AT5G09440
2,8	up	AT5G50450	2,7	up	AT2G13431	2,6	up	AT5G42120
2,8	up	AT3G56420	2,7	up	AT1G18330	2,6	up	AJ505688
2,8	up	AT5G15620	2,7	up	AT5G15420	2,6	up	AT5G16110
2,8	up	AT1G27260	2,7	up	AT1G50290	2,6	up	AT1G09880
2,8	up	AT4G35560	2,7	up	AT1G55580	2,6	up	AT3G01490
2,8	up	AT3G59530	2,7	up	AT1G30820	2,6	up	TA28000_3702
2,8	up	AT3G07450	2,7	up	AT3G22961	2,6	up	AT3G45780
2,8	up	AT5G15330	2,7	up	AT1G20480	2,6	up	AT5G63195
2,8	up	AT1G67238	2,7	up	AT2G23690	2,6	up	AT1G18990
2,8	up	AT2G30520	2,7	up	AT1G75030	2,6	up	AI993707
2,8	up	AT4G37390	2,7	up	AT1G22740	2,6	up	NP332587
2,8	up	AT4G37730	2,7	up	TC309871	2,6	up	AT5G20420
2,8	up	AT2G43670	2,7	up	AT4G17460	2,6	up	AT2G03030
2,8	up	AT2G15030	2,7	up	AT1G49200	2,6	up	AT5G46410
2,8	up	AT3G61185	2,7	up	AT1G75050	2,6	up	AT4G16045
2,8	up	AT2G17550	2,7	up	AT3G29575	2,6	up	CD533049
2,8	up	AT2G16890	2,7	up	AT1G68740	2,6	up	AT5G49340
2,8	up	AT5G50950	2,7	up	AT3G53910	2,6	up	AT1G68190
2,8	up	AT1G66330	2,7	up	TA36998_3702	2,6	up	AT5G52415
2,8	up	AT1G11175	2,7	up	AT1G55600	2,6	up	TC284498
2,8	up	AT1G15670	2,7	up	AT2G31210	2,6	up	AT4G27250
2,8	up	AT1G02640	2,7	up	AT2G47180	2,6	up	AT4G03455
2,8	up	AT2G15890	2,7	up	AT2G26355	2,5	up	AT1G03610
2,8	up	AT1G70130	2,7	up	AT1G28130	2,5	up	AT4G14730
2,8	up	AT2G35800	2,7	up	AT5G57655	2,5	up	AT1G23390
2,8	up	AT1G74670	2,7	up	AT1G76610	2,5	up	AT2G26355
2,8	up	AT1G23390	2,7	up	AT1G49500	2,5	up	AT2G22660
2,8	up	AT5G57655	2,7	up	AT2G13360	2,5	up	AT1G76560
2,8	up	TA33267_3702	2,7	up	AT5G67110	2,5	up	AT4G20140
2,8	up	AT1G76500	2,7	up	AT1G22980	2,5	up	AT5G66300
2,8	up	AT5G58950	2,7	up	AT1G56220	2,5	up	AT1G22370
2,8	up	AT4G22753	2,7	up	TA44625_3702	2,5	up	TA29223_3702
2,8	up	AT1G78480	2,7	up	AT3G20190	2,5	up	AT1G23150
2,8	up	AT2G30520	2,7	up	AT2G21650	2,5	up	AT5G03240
2,8	up	BP625695	2,7	up	TA28320_3702	2,5	up	AT2G18700
2,8	up	AT4G16550	2,7	up	AT5G39890	2,5	up	AT3G43863
2,8	up	AT2G13360	2,7	up	AT1G19660	2,5	up	AT3G49790
2,8	up	AT1G75160	2,7	up	AT1G27290	2,5	up	TC311858
2,8	up	AT2G36420	2,6	up	AT3G19070	2,5	up	AT2G18500
2,8	up	AT5G22430	2,6	up	AT2G02690	2,5	up	AT3G28345
2,8	up	TC293079	2,6	up	AT2G27920	2,5	up	AT2G35060
2,8	up	AT5G02840	2,6	up	TA32093_3702	2,5	up	AT2G35150
2,8	up	AT3G17675	2,6	up	TC310446	2,5	up	AT5G66590
2,8	up	TC305952	2,6	up	AT1G66330	2,5	up	AT1G18270
2,8	up	AT1G78460	2,6	up	AT3G15620	2,5	up	AT4G27000
2,8	up	AT3G47350	2,6	up	AT4G14530	2,5	up	AT1G20650
2,8	up	AT2G13130	2,6	up	AT4G35750	2,5	up	AT5G66220
2,8	up	AT4G18340	2,6	up	AT4G38000	2,5	up	AT3G48115
2,8	up	AT1G61810	2,6	up	AT5G21150	2,5	up	AT1G68190
2,7	up	AT4G14600	2,6	up	AT3G62750	2,5	up	AT3G53420
2,7	up	AT4G07408	2,6	up	AT5G57090	2,5	up	AT2G21730
2,7	up	AT2G30520	2,6	up	AT3G60190	2,5	up	AT4G21970
2,7	up	AT5G02020	2,6	up	AT5G19120	2,5	up	AT1G20240
2,7	up	AT5G05810	2,6	up	AT2G21680	2,5	up	AT4G15660
2,7	up	AT5G55040	2,6	up	CK120025	2,5	up	AT4G36060
2,7	up	AT1G06920	2,6	up	AT5G27920	2,5	up	AT1G02470
2,7	up	AV531994	2,6	up	AT4G37310	2,5	up	TA27833_3702

5. Anhang

2,5	up	AT4G27790	2,4	up	AT1G22640	2,3	up	AT2G18700
2,5	up	TC308063	2,4	up	AY057511	2,3	up	AT5G23730
2,5	up	AT2G38820	2,4	up	AT4G03360	2,3	up	AT2G03250
2,5	up	AT5G54075	2,4	up	AT1G61500	2,3	up	AT4G24600
2,5	up	AT4G00610	2,4	up	AT2G20870	2,3	up	AT5G67060
2,5	up	AT2G31945	2,4	up	AT4G17490	2,3	up	AT5G16110
2,5	up	EG470688	2,4	up	AT4G04760	2,3	up	AT1G15350
2,5	up	AT5G06100	2,4	up	AT4G22210	2,3	up	AT3G25260
2,5	up	AT5G51900	2,4	up	AV533915	2,3	up	AT1G68020
2,5	up	AT4G32990	2,4	up	AT5G66010	2,3	up	AY062586
2,5	up	AT3G12720	2,4	up	AT1G76490	2,3	up	AT5G35970
2,5	up	AT2G21430	2,4	up	AT1G16940	2,3	up	AT1G54035
2,5	up	AY080619	2,4	up	AT1G23390	2,3	up	TC310821
2,5	up	AT5G14410	2,4	up	AT4G28140	2,3	up	AT5G64820
2,5	up	AT1G18020	2,4	up	AT1G69760	2,3	up	AT1G68010
2,5	up	AT1G36070	2,4	up	AT3G02030	2,3	up	AT1G47655
2,5	up	AT4G36900	2,4	up	TA26755_3702	2,3	up	AT2G32710
2,5	up	AT5G57510	2,4	up	AT1G09460	2,3	up	TC313262
2,5	up	AT4G28530	2,4	up	AT5G38820	2,3	up	BX828916
2,5	up	TC306697	2,4	up	AT1G32700	2,3	up	AT2G17550
2,5	up	AT4G24860	2,4	up	AT3G13660	2,3	up	AT5G47530
2,5	up	AT2G46990	2,4	up	AT4G30790	2,3	up	AT3G48115
2,5	up	AT2G18880	2,4	up	AT1G60983	2,3	up	AT2G40420
2,5	up	AT1G56220	2,4	up	AT5G23380	2,3	up	AT1G73260
2,5	up	AT5G26580	2,4	up	AT2G22680	2,3	up	AV819379
2,5	up	AT1G52140	2,4	up	DQ108699	2,3	up	AT1G31935
2,5	up	AT3G25190	2,4	up	AT1G11260	2,3	up	AT3G19680
2,4	up	AT1G62480	2,4	up	AT4G21200	2,3	up	AT3G62500
2,4	up	AT2G20120	2,4	up	AT1G75800	2,3	up	AT2G36270
2,4	up	AT3G15850	2,4	up	AT1G16730	2,3	up	AT4G24950
2,4	up	AT2G18890	2,3	up	TA35013_3702	2,3	up	AT2G18196
2,4	up	AT4G36060	2,3	up	AT4G33666	2,3	up	AT2G47180
2,4	up	AT3G14810	2,3	up	AT5G47590	2,3	up	T46212
2,4	up	AT2G31810	2,3	up	AT4G35783	2,3	up	AT2G17300
2,4	up	AT2G35640	2,3	up	AT5G11070	2,3	up	AT3G61410
2,4	up	EG488648	2,3	up	AT3G20130	2,3	up	AT2G40160
2,4	up	TC312589	2,3	up	AT4G37300	2,3	up	AT1G21400
2,4	up	AT5G48485	2,3	up	AT5G23260	2,3	up	AT5G53950
2,4	up	AT1G23770	2,3	up	AT5G54740	2,3	up	AT3G27150
2,4	up	AT1G78720	2,3	up	BX834114	2,3	up	AT1G14688
2,4	up	AT5G02180	2,3	up	AT3G23840	2,3	up	AT1G06520
2,4	up	AT1G05340	2,3	up	AT1G26920	2,3	up	AT5G63190
2,4	up	AT1G54575	2,3	up	AT4G28556	2,3	up	AV441056
2,4	up	AT1G46554	2,3	up	AV537788	2,3	up	AT2G38210
2,4	up	AT1G13290	2,3	up	AT1G23870	2,3	up	AT1G12440
2,4	up	AT3G11340	2,3	up	AT2G22980	2,3	up	AT4G36730
2,4	up	AT2G36320	2,3	up	CB074329	2,3	up	AT4G26580
2,4	up	EG495029	2,3	up	AT5G05440	2,3	up	AT1G76460
2,4	up	AT5G65207	2,3	up	AV564310	2,3	up	AT5G54510
2,4	up	BE038720	2,3	up	AT1G75430	2,3	up	TC305446
2,4	up	AT3G62650	2,3	up	AT1G56220	2,3	up	AT5G14000
2,4	up	AK230127	2,3	up	AT3G20395	2,3	up	AT5G23340
2,4	up	BP826483	2,3	up	AT1G12440	2,3	up	AT2G31585
2,4	up	AT3G49480	2,3	up	AT5G09440	2,3	up	AT5G44417
2,4	up	AT1G62260	2,3	up	AT3G23255	2,3	up	AT5G53950
2,4	up	AT4G35240	2,3	up	AT5G57560	2,2	up	AT2G41290
2,4	up	AT3G61111	2,3	up	AT4G35780	2,2	up	AT2G42890
2,4	up	AT1G73066	2,3	up	AT1G75800	2,2	up	AT3G28470
2,4	up	AT5G04150	2,3	up	AT3G02140	2,2	up	AT5G23350
2,4	up	AT5G04080	2,3	up	AT2G46720	2,2	up	AT1G55152
2,4	up	AT2G03710	2,3	up	AT4G21590	2,2	up	BP609708
2,4	up	AT2G31810	2,3	up	AT4G36730	2,2	up	AT3G17580
2,4	up	AT4G24810	2,3	up	AT1G69570	2,2	up	AT4G35750
2,4	up	AT1G68010	2,3	up	AT1G36070	2,2	up	AT1G75180
2,4	up	BP600644	2,3	up	AT1G10020	2,2	up	AT1G79700
2,4	up	AT1G01590	2,3	up	AT4G04840	2,2	up	AT5G37415
2,4	up	AT2G33010	2,3	up	AT1G18486	2,2	up	AT5G44670
2,4	up	AT3G26740	2,3	up	AT5G07680	2,2	up	AT5G23155
2,4	up	TC312868	2,3	up	AT1G20650	2,2	up	AT1G07600

5. Anhang

2,2	up	AT2G13660	2,2	up	AT1G53910	2,1	up	AT2G37170
2,2	up	AT3G12470	2,2	up	TA49656_3702	2,1	up	AT3G58780
2,2	up	AT2G26710	2,2	up	AT1G29970	2,1	up	AT1G11530
2,2	up	AT4G19230	2,2	up	AT2G23790	2,1	up	AT3G49300
2,2	up	AT4G18550	2,2	up	AT3G20450	2,1	up	AT1G16240
2,2	up	AT4G35090	2,2	up	AT5G27220	2,1	up	AT1G29970
2,2	up	AT5G07490	2,2	up	AT5G05670	2,1	up	AT1G73120
2,2	up	AT5G50080	2,2	up	AT5G04980	2,1	up	AT5G07080
2,2	up	AT5G42630	2,2	up	AT4G33150	2,1	up	DQ108797
2,2	up	AT3G61360	2,2	up	AT1G01620	2,1	up	AY087838
2,2	up	AT5G40680	2,2	up	TA35430_3702	2,1	up	AT3G30340
2,2	up	AT5G59580	2,2	up	AT5G03795	2,1	up	AT5G22240
2,2	up	AT1G68540	2,2	up	AT1G15740	2,1	up	AT2G18200
2,2	up	AT2G01850	2,2	up	AT5G23590	2,1	up	AT5G24800
2,2	up	AT3G61900	2,2	up	AT2G25964	2,1	up	AT5G43725
2,2	up	AT1G74840	2,1	up	AT4G05150	2,1	up	AT3G20300
2,2	up	AT4G07600	2,1	up	AT1G04295	2,1	up	AT1G74840
2,2	up	AT1G68360	2,1	up	AT2G12550	2,1	up	AT2G36900
2,2	up	AT2G34315	2,1	up	AT5G64880	2,1	up	TA32137_3702
2,2	up	AT1G10060	2,1	up	AT4G27410	2,1	up	AT5G02380
2,2	up	TA44070_3702	2,1	up	AT1G03055	2,1	up	AT1G15175
2,2	up	AT5G15120	2,1	up	AT2G34420	2,1	up	AT5G62100
2,2	up	AT1G09570	2,1	up	AT3G19240	2,1	up	TA36063_3702
2,2	up	AT3G05930	2,1	up	AT2G01940	2,1	up	AT5G54080
2,2	up	AV562266	2,1	up	AT3G49520	2,1	up	AT1G32120
2,2	up	AT3G26740	2,1	up	AT4G38690	2,1	up	TA44937_3702
2,2	up	AT3G29240	2,1	up	TC310098	2,1	up	AT5G57887
2,2	up	AV786366	2,1	up	AT5G51890	2,1	up	AT5G24490
2,2	up	AT5G58050	2,1	up	BP835218	2,1	up	AT2G18160
2,2	up	AT5G46410	2,1	up	AT5G10450	2,1	up	AT5G05440
2,2	up	AT1G03610	2,1	up	AT4G31110	2,1	up	AT1G15350
2,2	up	AT5G24735	2,1	up	AT2G38820	2,1	up	DR382193
2,2	up	AT4G27950	2,1	up	AT5G66580	2,1	up	AT1G73910
2,2	up	AT4G27360	2,1	up	AT3G13061	2,1	up	AT2G33510
2,2	up	AT1G05840	2,1	up	AT1G61740	2,1	up	AT1G16240
2,2	up	AT1G06420	2,1	up	TC293720	2,1	up	AT5G54080
2,2	up	AT2G22850	2,1	up	TC301624	2,1	up	EG500604
2,2	up	AT4G37300	2,1	up	AT5G25810	2,1	up	AT3G48530
2,2	up	AT2G35160	2,1	up	AT4G35750	2,1	up	AT2G12550
2,2	up	AT4G21510	2,1	up	AT3G28390	2,1	up	AT1G60120
2,2	up	AT4G04480	2,1	up	ATMG00030	2,1	up	AT1G10060
2,2	up	AT1G70700	2,1	up	AT1G35516	2,1	up	AT5G55720
2,2	up	AT1G14640	2,1	up	AT3G11680	2,1	up	BP803304
2,2	up	AT2G15910	2,1	up	AT5G04980	2,1	up	AT3G06900
2,2	up	AT4G38690	2,1	up	AT3G44610	2,1	up	AT5G61605
2,2	up	AT5G18670	2,1	up	AT1G22980	2,1	up	AT3G45420
2,2	up	AT1G67530	2,1	up	AT3G29240	2,1	up	AT5G44260
2,2	up	AT1G76530	2,1	up	AT4G14720	2,1	up	AT1G15670
2,2	up	AT3G26740	2,1	up	AT5G10150	2,1	up	AT1G64618
2,2	up	AT1G18265	2,1	up	AT2G41040	2,1	up	AT4G31140
2,2	up	AT2G42890	2,1	up	AT1G06420	2,1	up	AT3G61680
2,2	up	AT1G16250	2,1	up	AT3G60020	2,1	up	TA50569_3702
2,2	up	AT2G43340	2,1	up	AT5G63190	2,1	up	AT1G72820
2,2	up	AT3G47470	2,1	up	AT4G31730	2,1	up	AT1G10480
2,2	up	AT3G59940	2,1	up	AT5G40740	2,1	up	BX834431
2,2	up	AT5G52390	2,1	up	AT5G13240	2,1	up	AT1G58235
2,2	up	AT4G10610	2,1	up	AT4G16460	2,1	up	AT4G39780
2,2	up	AT4G38690	2,1	up	AT1G33700	2,1	up	AT1G74840
2,2	up	AT3G51840	2,1	up	AT2G33880	2,1	up	AT5G52250
2,2	up	AT4G05070	2,1	up	AT4G30110	2,1	up	AT4G14620
2,2	up	AT5G10450	2,1	up	BX822927	2,1	up	AT2G18160
2,2	up	AT1G79760	2,1	up	AT3G12450	2,0	up	AT5G63770
2,2	up	AT2G44500	2,1	up	AT3G06455	2,0	up	AT1G15260
2,2	up	AT1G10060	2,1	up	AT4G13830	2,0	up	AT5G24735
2,2	up	TA29617_3702	2,1	up	AT5G20380	2,0	up	AT4G16690
2,2	up	AT1G22160	2,1	up	AT2G38230	2,0	up	AT1G59700
2,2	up	AT1G19230	2,1	up	AT4G21810	2,0	up	AT1G77230
2,2	up	AT1G21410	2,1	up	AT1G76990	2,0	up	AT5G58040
2,2	up	AT5G54160	2,1	up	AT1G77530	2,0	up	AT1G70660

5. Anhang

2,0	up	AT2G38185	2,0	down	AT2G47680	2,1	down	TA29470_3702
2,0	up	AT1G01570	2,0	down	AT2G02950	2,1	down	AT1G08050
2,0	up	TA48494_3702	2,0	down	AT5G50915	2,1	down	AT1G79710
2,0	up	AT1G19750	2,0	down	AT4G01270	2,1	down	AT4G27720
2,0	up	AT4G14315	2,0	down	AT4G06744	2,1	down	AT2G14750
2,0	up	TC311632	2,0	down	AT3G06985	2,1	down	AT5G26680
2,0	up	AT5G64260	2,0	down	AT3G59140	2,1	down	AT4G32440
2,0	up	DR379002	2,0	down	AK117569	2,1	down	AT1G64540
2,0	up	AT4G16880	2,0	down	AT5G26810	2,1	down	AT4G30540
2,0	up	AT4G32440	2,0	down	AT2G28460	2,1	down	AT1G47220
2,0	up	AT3G52105	2,0	down	AT4G01970	2,1	down	AT3G60540
2,0	up	AT4G17880	2,0	down	AT1G53790	2,1	down	AT2G27935
2,0	up	AT1G55810	2,0	down	AT4G14400	2,1	down	AT3G04060
2,0	up	AT1G63840	2,0	down	AT3G16400	2,1	down	AT4G30830
2,0	up	AT5G63190	2,0	down	AT1G78570	2,1	down	AT5G50915
2,0	up	AT3G09915	2,0	down	TA50489_3702	2,1	down	AT4G01270
2,0	up	AT3G12830	2,0	down	AT3G26500	2,1	down	AT5G61080
2,0	up	AT4G32440	2,0	down	AT3G01900	2,1	down	AT3G23450
2,0	up	AK118371	2,0	down	AT5G10000	2,1	down	AT3G47760
2,0	up	AT5G10278	2,0	down	AT1G13210	2,1	down	AT2G21810
2,0	up	AT1G28960	2,0	down	AT3G60328	2,1	down	AT3G30400
2,0	up	AT5G02380	2,0	down	AT2G34510	2,1	down	AT1G61430
2,0	up	AT4G35450	2,0	down	AT3G54730	2,1	down	AT5G22900
2,0	up	DR356400	2,0	down	AT1G76930	2,1	down	AT4G15330
2,0	up	AT4G32440	2,0	down	AT1G28680	2,1	down	AT1G51910
2,0	up	AT5G61440	2,0	down	AT1G05660	2,1	down	AT4G25900
2,0	up	AT5G65430	2,0	down	AT3G55300	2,1	down	AT4G12280
2,0	up	AT1G07200	2,0	down	AT5G17920	2,1	down	AT5G25820
2,0	up	AT1G08630	2,0	down	DQ108853	2,1	down	AT3G07000
2,0	up	AT2G40330	2,0	down	AT5G07640	2,1	down	AT2G15580
2,0	up	AT5G15240	2,0	down	AT3G11380	2,1	down	AT5G65020
2,0	up	AT5G64260	2,0	down	AT1G74490	2,1	down	AT5G56700
2,0	up	AT4G37890	2,0	down	AT5G37430	2,1	down	AT5G23510
2,0	up	AT4G10950	2,0	down	AT5G05320	2,1	down	AT3G59310
2,0	up	AT4G26140	2,0	down	AT3G21080	2,1	down	AT1G32270
2,0	up	AT1G33475	2,0	down	TC311438	2,1	down	AT3G07195
2,0	up	AT5G10450	2,0	down	AT4G21366	2,1	down	AT1G09970
2,0	up	AT1G02630	2,0	down	AT2G38830	2,1	down	AT1G54000
2,0	up	AT3G60460	2,0	down	AT3G44250	2,1	down	AT5G52640
2,0	up	AT2G01430	2,0	down	AT3G19930	2,1	down	AT1G68800
2,0	up	AT3G17760	2,0	down	AT5G18430	2,1	down	AT1G49910
2,0	up	NP454000	2,0	down	AT5G44635	2,1	down	AT2G41950
2,0	up	AT1G55510	2,0	down	AT1G19940	2,1	down	AT5G11570
2,0	up	AT2G07678	2,0	down	AT4G13880	2,1	down	AT5G51860
2,0	up	AT1G13448	2,0	down	AT4G25390	2,1	down	AT1G36745
2,0	up	AT4G27780	2,0	down	AT1G20680	2,1	down	AT4G36220
2,0	up	AT3G16240	2,0	down	AT2G13660	2,1	down	AT3G61760
2,0	up	AT2G45245	2,0	down	AT3G45710	2,1	down	AT4G04601
2,0	up	AT1G02900	2,0	down	AT4G34881	2,1	down	AT4G36640
2,0	up	AT5G60680	2,0	down	AT5G47910	2,1	down	AT3G46658
2,0	up	AT1G01620	2,0	down	AT4G26990	2,1	down	AT5G62220
2,0	up	BX832960	2,0	down	AT1G62290	2,1	down	AT1G53920
2,0	up	AT5G39660	2,0	down	AT2G02010	2,1	down	AT2G27010
2,0	up	AT1G05770	2,0	down	AT5G56010	2,1	down	AT1G13130
2,0	up	AT4G34600	2,1	down	NP230979	2,1	down	AT3G16470
2,0	down	AT1G07370	2,1	down	AT3G09490	2,1	down	AT2G34230
2,0	down	AT3G48510	2,1	down	TA29286_3702	2,1	down	AT3G10710
2,0	down	BP839700	2,1	down	AT5G44460	2,1	down	AT1G01630
2,0	down	AT1G04580	2,1	down	AT2G33205	2,1	down	AT5G67460
2,0	down	AT1G35720	2,1	down	AT3G03060	2,1	down	AT4G20800
2,0	down	AT1G23100	2,1	down	AT1G17745	2,1	down	AT1G74360
2,0	down	AT5G17700	2,1	down	AT4G21400	2,1	down	TA35339_3702
2,0	down	TC310572	2,1	down	AT1G64670	2,1	down	AT4G14680
2,0	down	ATMG01290	2,1	down	AT2G11570	2,1	down	AT4G13930
2,0	down	BX828813	2,1	down	AT1G75150	2,1	down	AT1G64390
2,0	down	AT2G03900	2,1	down	EF183054	2,1	down	AT5G55650
2,0	down	CD532105	2,1	down	AT3G02230	2,1	down	AT2G42530
2,0	down	AT3G17980	2,1	down	AT2G19400	2,1	down	AT2G11778
2,0	down	TA27519_3702	2,1	down	AT4G03230	2,1	down	AT4G01750

5. Anhang

2,1	down	AT3G17390	2,2	down	AV809562	2,2	down	AT4G21960
2,1	down	AT5G55050	2,2	down	AT3G14310	2,2	down	AT5G11950
2,1	down	AT3G28630	2,2	down	AT1G32337	2,2	down	AT1G18490
2,1	down	AT2G42980	2,2	down	EG449086	2,2	down	AT1G78360
2,1	down	AT1G14390	2,2	down	AT2G40520	2,2	down	AT3G37390
2,1	down	AT5G52790	2,2	down	AT1G52580	2,2	down	AT5G49910
2,1	down	AT2G14100	2,2	down	AT2G24580	2,2	down	AT5G65810
2,1	down	AT1G64390	2,2	down	AT3G46110	2,2	down	AT5G50915
2,1	down	AT5G26680	2,2	down	AT1G16360	2,2	down	AT2G32280
2,1	down	AT5G12010	2,2	down	AT3G09940	2,2	down	AT3G59270
2,1	down	AT5G05620	2,2	down	AT4G21960	2,2	down	AT3G23450
2,1	down	AT4G18030	2,2	down	TA33113_3702	2,2	down	AV543658
2,1	down	AT1G37012	2,2	down	TA32347_3702	2,2	down	AT3G56410
2,1	down	AT2G22170	2,2	down	TC302628	2,2	down	AT3G09830
2,1	down	AT1G29620	2,2	down	AT2G39980	2,2	down	AT3G23820
2,1	down	AT2G01300	2,2	down	W43751	2,2	down	AT5G06300
2,1	down	TC293967	2,2	down	AT3G03000	2,2	down	AT1G51830
2,1	down	AK229737	2,2	down	AT2G41120	2,2	down	AT1G61360
2,1	down	AT3G30852	2,2	down	AT3G48850	2,2	down	AT3G05920
2,1	down	AT2G48150	2,2	down	AT5G61790	2,2	down	AT1G57630
2,1	down	AT2G40520	2,2	down	AT5G24040	2,2	down	AT2G04780
2,1	down	AT4G00315	2,2	down	AT3G54710	2,2	down	AT2G33710
2,1	down	AT3G44400	2,2	down	AT5G54950	2,2	down	AT4G39730
2,1	down	BX842297	2,2	down	AT5G65158	2,2	down	AT2G14820
2,1	down	AT1G64563	2,2	down	AT4G17760	2,2	down	AT3G51920
2,1	down	AT4G02110	2,2	down	AT1G24030	2,2	down	AT3G26450
2,1	down	AT1G53230	2,2	down	AT4G08480	2,2	down	AT3G43800
2,1	down	AT3G32040	2,2	down	AT1G52200	2,2	down	AT5G24200
2,1	down	AT3G53232	2,2	down	AT4G23610	2,2	down	AT1G29980
2,1	down	AT3G17130	2,2	down	EL990887	2,2	down	AT1G03230
2,1	down	AT1G17400	2,2	down	AT2G21850	2,2	down	AT1G17590
2,1	down	AT2G45403	2,2	down	AT5G44582	2,2	down	AT5G09370
2,1	down	AT4G15970	2,2	down	AT5G14330	2,2	down	AT3G08970
2,1	down	AT4G23790	2,2	down	AT5G65810	2,2	down	AT5G22470
2,1	down	AT5G27100	2,2	down	AT5G39080	2,2	down	AT4G16730
2,1	down	AT3G43270	2,2	down	AT1G41830	2,2	down	NP502402
2,1	down	AT3G04445	2,2	down	TC312048	2,2	down	AT1G26590
2,1	down	AT1G23100	2,2	down	TA35682_3702	2,2	down	AT2G25220
2,1	down	AT1G63220	2,2	down	AT3G08720	2,2	down	AT1G68390
2,1	down	AT2G06562	2,2	down	AT1G10705	2,2	down	AT1G62300
2,1	down	BP583543	2,2	down	AT2G28950	2,2	down	AT3G23570
2,1	down	AT2G04780	2,2	down	DR749901	2,2	down	AT1G18090
2,1	down	AT3G59080	2,2	down	AT3G48350	2,2	down	BP799262
2,1	down	AT3G17140	2,2	down	TC285395	2,2	down	AT5G66840
2,1	down	AT1G43910	2,2	down	AT4G34610	2,2	down	AT3G57640
2,1	down	AT3G22510	2,2	down	AT5G56010	2,2	down	AT1G75780
2,1	down	AT1G61095	2,2	down	NP043480	2,2	down	AT2G36880
2,1	down	AT3G26460	2,2	down	AT4G37450	2,2	down	AT4G08750
2,1	down	AT5G42020	2,2	down	TA48802_3702	2,2	down	AT4G28365
2,1	down	BX821371	2,2	down	AT3G25882	2,2	down	AT1G56470
2,1	down	AT3G21150	2,2	down	AT5G10220	2,2	down	AT1G10747
2,1	down	AT1G66140	2,2	down	AT5G28490	2,2	down	AT5G48657
2,1	down	AT2G19980	2,2	down	AT2G18720	2,2	down	AT4G28485
2,1	down	AT1G64390	2,2	down	AT5G56350	2,2	down	AT2G36880
2,1	down	TC314070	2,2	down	AT3G24508	2,2	down	AT3G28180
2,1	down	AT3G17280	2,2	down	AT1G53920	2,2	down	AT1G53070
2,1	down	AT5G60530	2,2	down	AT5G41460	2,2	down	AT2G04260
2,1	down	AT2G46970	2,2	down	AT1G70380	2,2	down	AT3G43960
2,1	down	AT1G27330	2,2	down	AT2G13330	2,2	down	AT2G11850
2,1	down	AT2G32270	2,2	down	AT1G16110	2,2	down	AT2G03530
2,1	down	AT1G33860	2,2	down	AT2G40150	2,2	down	AT4G23190
2,1	down	AT1G51250	2,2	down	AT3G21945	2,2	down	AT5G55650
2,2	down	AT1G03230	2,2	down	TC306950	2,2	down	AT2G18300
2,2	down	AT4G00955	2,2	down	AT2G37710	2,2	down	AT1G54640
2,2	down	AT4G39730	2,2	down	AT1G30160	2,2	down	AT2G29720
2,2	down	AT2G32160	2,2	down	AT4G12334	2,2	down	TA36021_3702
2,2	down	AT1G64390	2,2	down	AT1G18940	2,2	down	AT4G09570
2,2	down	TA34519_3702	2,2	down	AT1G11785	2,2	down	AT2G47130
2,2	down	AT4G28430	2,2	down	AT3G52748	2,2	down	AT2G24285

5. Anhang

2,2	down	AT3G26450	2,3	down	AT3G25670	2,4	down	AT1G33811
2,2	down	AT3G50350	2,3	down	AT5G34602	2,4	down	AT1G68470
2,2	down	AT5G15500	2,3	down	DQ108697	2,4	down	AT1G12130
2,2	down	AT4G22690	2,3	down	AT2G31270	2,4	down	AT1G63857
2,2	down	AT3G14760	2,3	down	AT1G33440	2,4	down	AT5G11790
2,3	down	AT2G46160	2,3	down	AT5G50590	2,4	down	AT5G52310
2,3	down	AT1G30475	2,3	down	AT2G21830	2,4	down	AT4G27560
2,3	down	AT2G20750	2,3	down	AT1G01520	2,4	down	AT2G37260
2,3	down	AT2G26380	2,3	down	AT2G22180	2,4	down	AT3G18950
2,3	down	AT5G61000	2,3	down	AT1G27030	2,4	down	AK230093
2,3	down	AT3G54940	2,3	down	AT1G32172	2,4	down	AT5G65010
2,3	down	CB257139	2,3	down	AT4G13930	2,4	down	AT4G36430
2,3	down	AT4G16750	2,3	down	AT1G26730	2,4	down	AT1G59970
2,3	down	AT5G49680	2,3	down	AT4G01910	2,4	down	AT2G18000
2,3	down	AT4G00580	2,3	down	AT2G21210	2,4	down	EG510390
2,3	down	TC286144	2,3	down	BP588856	2,4	down	TC308014
2,3	down	AT2G35590	2,3	down	AT1G74660	2,4	down	AT4G23790
2,3	down	NP456905	2,3	down	AT1G58410	2,4	down	AV807992
2,3	down	AT2G34238	2,3	down	EG516557	2,4	down	TA50727_3702
2,3	down	AT5G52930	2,3	down	AT2G20980	2,4	down	AT4G18250
2,3	down	AT3G43290	2,3	down	TA25881_3702	2,4	down	AT5G07780
2,3	down	AT4G29030	2,3	down	AT1G24280	2,4	down	AT5G55930
2,3	down	AT4G20230	2,3	down	AT1G26770	2,4	down	AT2G47780
2,3	down	AT2G20560	2,3	down	AT4G21960	2,4	down	AT5G58610
2,3	down	AT5G41663	2,3	down	AT4G30060	2,4	down	AT1G65370
2,3	down	AT1G25425	2,3	down	AT3G18485	2,4	down	AT5G10410
2,3	down	AT3G52740	2,3	down	TC304383	2,4	down	AT2G17010
2,3	down	AT3G57200	2,3	down	AT2G25220	2,4	down	AT4G13690
2,3	down	AT1G64390	2,3	down	AT2G24170	2,4	down	AT5G61412
2,3	down	AT2G30870	2,3	down	TA53423_3702	2,4	down	AT4G25630
2,3	down	AT2G01340	2,3	down	AT4G05497	2,4	down	AT4G25940
2,3	down	AT4G35320	2,3	down	AT3G29030	2,4	down	AT5G46260
2,3	down	AT2G27540	2,3	down	AT2G39350	2,4	down	AT1G02205
2,3	down	AT1G60989	2,3	down	AT2G35570	2,4	down	AT5G11950
2,3	down	AT5G61030	2,3	down	AT1G21220	2,4	down	AT5G17450
2,3	down	AT4G21930	2,3	down	DQ108674	2,4	down	AT3G25090
2,3	down	AT3G50470	2,3	down	EF183220	2,4	down	AT4G18030
2,3	down	AT4G35060	2,3	down	AT5G66280	2,4	down	AT4G39340
2,3	down	AT2G28550	2,3	down	AT3G60440	2,4	down	TA37162_3702
2,3	down	AT5G15470	2,3	down	AT1G53790	2,4	down	TA33597_3702
2,3	down	AT3G11325	2,3	down	AT3G29590	2,4	down	AT1G35410
2,3	down	AT5G24810	2,3	down	AT4G30060	2,4	down	AT1G66570
2,3	down	TC297452	2,3	down	AT1G48340	2,4	down	AT1G75900
2,3	down	AT5G36670	2,3	down	AT1G09720	2,4	down	AT5G57920
2,3	down	AT3G50030	2,3	down	AT3G30320	2,4	down	BP822426
2,3	down	AT1G71400	2,3	down	AT1G65450	2,4	down	AT4G29690
2,3	down	AT2G24615	2,3	down	AT4G01920	2,4	down	AT2G02103
2,3	down	AT1G29179	2,3	down	AT3G17290	2,4	down	AT2G46680
2,3	down	TC301265	2,3	down	AT4G22710	2,4	down	AT4G23810
2,3	down	AT3G11050	2,3	down	AT3G46110	2,4	down	AT3G10590
2,3	down	AT5G61240	2,3	down	AT3G55940	2,4	down	AT4G17250
2,3	down	TA50541_3702	2,3	down	AT1G71880	2,4	down	AT1G72900
2,3	down	EG474653	2,3	down	AT1G04680	2,4	down	AT4G14440
2,3	down	AT5G43170	2,3	down	AT2G15580	2,4	down	AT4G28350
2,3	down	AT5G37590	2,3	down	AT1G12220	2,4	down	AT4G16950
2,3	down	AT2G41090	2,3	down	AT2G34920	2,4	down	R90101
2,3	down	AT2G43870	2,3	down	AT2G19210	2,4	down	AT1G30757
2,3	down	AT5G44316	2,3	down	AT1G06360	2,4	down	AT5G61270
2,3	down	AT2G39210	2,3	down	BP844281	2,4	down	AT5G47380
2,3	down	AT5G03760	2,3	down	AT4G30530	2,4	down	AT5G39370
2,3	down	AT5G28823	2,3	down	AT3G56330	2,4	down	AT3G61898
2,3	down	AT5G62220	2,3	down	AT2G16310	2,4	down	AT5G65550
2,3	down	AT4G38420	2,3	down	AT3G45650	2,4	down	AT2G02110
2,3	down	AT1G16022	2,3	down	AT4G25860	2,4	down	AT4G27300
2,3	down	AT5G35660	2,3	down	AT3G49220	2,4	down	AT3G19040
2,3	down	AT2G36880	2,3	down	AT1G02970	2,4	down	AT1G51120
2,3	down	AT4G35900	2,3	down	AT5G48390	2,4	down	AT1G68620
2,3	down	AT4G23340	2,3	down	AT3G53290	2,4	down	AT1G69730
2,3	down	AT1G65445	2,3	down	AT1G06640	2,4	down	AT1G34460

5. Anhang

2,4	down	AT1G08500	2,5	down	AT3G25730	2,6	down	AT5G38010
2,4	down	AT4G22530	2,5	down	AT1G13550	2,6	down	AT5G18270
2,4	down	AT5G01820	2,5	down	AT5G39720	2,6	down	AT1G01900
2,4	down	AT4G13330	2,5	down	NP227247	2,6	down	BX839026
2,4	down	AT1G05880	2,5	down	AT3G46540	2,6	down	AT1G27940
2,4	down	AT5G65870	2,5	down	AT1G58270	2,6	down	AT1G37140
2,4	down	AT5G48430	2,5	down	BX838959	2,6	down	AT1G62840
2,4	down	AT3G54640	2,5	down	TC312958	2,6	down	AT1G28710
2,4	down	AT3G30405	2,5	down	AT3G56410	2,6	down	AT4G24170
2,4	down	AT5G09370	2,5	down	AT4G29760	2,6	down	AT1G22350
2,4	down	AT3G12900	2,5	down	AT3G14225	2,6	down	AT1G53660
2,4	down	AT5G56350	2,5	down	AT5G25440	2,6	down	AT1G19350
2,4	down	AT1G31200	2,5	down	AT4G29030	2,6	down	AT4G34250
2,4	down	AT1G67000	2,5	down	AT3G22235	2,6	down	AT5G20430
2,4	down	AT3G21370	2,5	down	AT1G26770	2,6	down	AT4G21380
2,4	down	AT3G07800	2,5	down	AT5G39090	2,6	down	AT3G47050
2,4	down	AT1G44100	2,5	down	AT3G04140	2,6	down	AT2G47240
2,4	down	AV806701	2,5	down	AT5G06720	2,6	down	AT2G19990
2,4	down	EF183092	2,5	down	AT1G60590	2,6	down	AT5G27610
2,4	down	AT4G09880	2,5	down	AT3G17390	2,6	down	AT3G30415
2,4	down	AT2G26530	2,5	down	AT3G45140	2,6	down	AT5G09470
2,4	down	AT4G38550	2,5	down	AT5G16970	2,6	down	AT3G04650
2,4	down	BE039478	2,5	down	AT5G66980	2,6	down	AT1G56240
2,4	down	AT2G28260	2,5	down	AT5G61740	2,6	down	AT4G02390
2,4	down	AT5G36925	2,5	down	AT3G61820	2,6	down	AT4G10040
2,4	down	TC309594	2,5	down	AT3G17390	2,6	down	AT1G33300
2,4	down	AT1G16120	2,5	down	AT1G72660	2,6	down	AT2G24160
2,4	down	AT5G66630	2,5	down	CD530924	2,6	down	AT3G10986
2,4	down	AT1G06830	2,5	down	AT1G32770	2,6	down	AT5G10380
2,4	down	AT2G02810	2,5	down	AT1G06360	2,6	down	TA36299_3702
2,4	down	AT1G09310	2,5	down	AT1G55450	2,6	down	AT2G25330
2,4	down	AT3G06035	2,5	down	AT4G33370	2,6	down	AT2G27775
2,4	down	AT4G15975	2,5	down	AT3G49780	2,6	down	AT1G52400
2,4	down	AT3G21050	2,5	down	AT5G43470	2,6	down	AT5G48450
2,4	down	AT5G07322	2,5	down	AT1G56580	2,6	down	AT3G05750
2,4	down	AT1G59870	2,5	down	AT2G34850	2,6	down	AT3G45140
2,4	down	AT1G05135	2,5	down	AT1G24909	2,6	down	AT2G31990
2,4	down	AT5G12000	2,5	down	AT5G38260	2,6	down	EG521465
2,5	down	AT3G61177	2,5	down	AT5G01640	2,6	down	AT4G34250
2,5	down	AT1G77510	2,5	down	AT5G53370	2,6	down	AT2G31390
2,5	down	AT1G76430	2,5	down	AT5G09910	2,6	down	AT1G62540
2,5	down	AT2G33070	2,5	down	AT1G62333	2,6	down	AT1G65510
2,5	down	AT4G29900	2,5	down	AT1G67180	2,6	down	TA45275_3702
2,5	down	AT3G27060	2,5	down	AT1G49150	2,6	down	AT3G13090
2,5	down	AT5G18310	2,5	down	AT4G38420	2,6	down	AT1G69818
2,5	down	AT4G19130	2,5	down	AT3G27060	2,6	down	AT4G01770
2,5	down	AT1G53470	2,5	down	AT2G13800	2,6	down	BX836657
2,5	down	NP173284	2,5	down	TA49915_3702	2,6	down	AT2G37910
2,5	down	TC282242	2,5	down	AT1G65481	2,6	down	AT1G13330
2,5	down	AT2G01340	2,5	down	AT1G10990	2,6	down	AT1G35750
2,5	down	AT3G23326	2,5	down	AT5G15380	2,6	down	AT1G36936
2,5	down	AT1G59860	2,5	down	AT3G07800	2,6	down	AT1G69530
2,5	down	AT2G42850	2,5	down	AT5G25470	2,6	down	AT3G22370
2,5	down	AT4G06597	2,5	down	AT1G50980	2,6	down	AT2G45780
2,5	down	AT3G30160	2,5	down	AT1G26840	2,6	down	AT4G25410
2,5	down	AT4G14360	2,6	down	AT4G12720	2,6	down	AT5G54970
2,5	down	AT3G19210	2,6	down	BU917428	2,6	down	AT2G31390
2,5	down	AT3G17390	2,6	down	AT4G38550	2,6	down	AT1G73000
2,5	down	AT1G09310	2,6	down	AT5G41170	2,6	down	AT3G22250
2,5	down	AT1G06000	2,6	down	AT2G13450	2,6	down	AT3G01040
2,5	down	AT4G00770	2,6	down	AT1G69730	2,6	down	AT3G43682
2,5	down	AT1G30160	2,6	down	AT1G62540	2,6	down	AT2G46410
2,5	down	AT5G52400	2,6	down	AT4G05590	2,6	down	AT1G33610
2,5	down	AT1G09310	2,6	down	AT3G48320	2,6	down	AT3G10320
2,5	down	AT2G45412	2,6	down	AT3G26450	2,6	down	AT4G23520
2,5	down	AT5G49630	2,6	down	AT4G15610	2,6	down	AT1G21310
2,5	down	AT4G36110	2,6	down	AT4G14746	2,6	down	AT1G52400
2,5	down	AT1G55450	2,6	down	AT2G20595	2,6	down	AT4G17250
2,5	down	AT3G05320	2,6	down	AT1G59960	2,6	down	AT4G11911

5. Anhang

2,6	down	NP221927	2,7	down	AT1G69710	2,8	down	AT2G44578
2,6	down	AT3G06142	2,7	down	AT3G16590	2,8	down	AT4G00360
2,6	down	AT5G08240	2,7	down	AT3G56920	2,8	down	AT1G68240
2,6	down	AT2G10965	2,7	down	AT1G09780	2,8	down	AT2G25810
2,6	down	AT5G10260	2,7	down	AT3G10660	2,8	down	AT2G36120
2,6	down	AT3G23450	2,7	down	AT5G20960	2,8	down	AT2G38010
2,6	down	AT3G48770	2,7	down	AT3G09260	2,8	down	AT4G05590
2,6	down	AT5G40230	2,7	down	AT1G14080	2,8	down	AT4G37530
2,6	down	AT1G11545	2,7	down	AT3G54830	2,8	down	AT1G23850
2,6	down	AT1G77100	2,7	down	AT1G35320	2,8	down	AT2G11600
2,6	down	AT1G71380	2,7	down	AT1G30660	2,8	down	AT1G68725
2,6	down	AT2G20619	2,7	down	AT1G34420	2,8	down	AT4G22415
2,6	down	AT5G40850	2,7	down	AT4G04220	2,8	down	AT5G45280
2,6	down	AT1G63940	2,7	down	AT1G27990	2,8	down	AT4G23240
2,6	down	AT1G24390	2,7	down	AT1G50760	2,9	down	AT5G52320
2,7	down	AT5G46520	2,7	down	AT1G76680	2,9	down	AT1G24735
2,7	down	AT4G27560	2,7	down	AT2G27000	2,9	down	AT5G24530
2,7	down	AT3G05650	2,7	down	AT4G10220	2,9	down	AT5G41761
2,7	down	AT1G04430	2,7	down	AT2G19130	2,9	down	AT1G17147
2,7	down	AT3G06830	2,7	down	AT3G50980	2,9	down	AT5G14890
2,7	down	AT3G08870	2,8	down	AT2G35700	2,9	down	AT3G20541
2,7	down	AT1G09310	2,8	down	AT4G23496	2,9	down	AT5G37950
2,7	down	AT5G04130	2,8	down	AT5G41610	2,9	down	AT3G16460
2,7	down	AT5G26920	2,8	down	AT1G48090	2,9	down	AT5G52740
2,7	down	AT4G28490	2,8	down	AT2G33850	2,9	down	AT1G67540
2,7	down	AT5G07930	2,8	down	AT3G14025	2,9	down	AV532673
2,7	down	AT1G56580	2,8	down	AT3G16030	2,9	down	AT2G04450
2,7	down	AT1G24100	2,8	down	AT5G25190	2,9	down	AT4G03480
2,7	down	AT1G69520	2,8	down	AT4G04220	2,9	down	AT3G43270
2,7	down	AT2G16586	2,8	down	TC309647	2,9	down	AT4G15610
2,7	down	AT5G44550	2,8	down	AT3G13100	2,9	down	AT4G29110
2,7	down	AT1G52400	2,8	down	AT3G43250	2,9	down	AT2G34580
2,7	down	AT2G38890	2,8	down	AT5G07110	2,9	down	AT5G55110
2,7	down	AT4G23700	2,8	down	AT5G44306	2,9	down	AT2G41940
2,7	down	AT3G14020	2,8	down	AT4G39840	2,9	down	AT5G57250
2,7	down	AT3G24780	2,8	down	AT2G26150	2,9	down	AT4G37010
2,7	down	TA34473_3702	2,8	down	AT4G27480	2,9	down	AT5G40850
2,7	down	AT5G54790	2,8	down	AT1G25450	2,9	down	AT2G37540
2,7	down	AT5G44050	2,8	down	AT4G08850	2,9	down	AT5G01790
2,7	down	AT3G22370	2,8	down	AT2G42250	2,9	down	AT4G21040
2,7	down	AT1G43600	2,8	down	AT4G23300	2,9	down	AT4G34135
2,7	down	TA25759_3702	2,8	down	AT2G38500	2,9	down	AT3G11080
2,7	down	AT5G54070	2,8	down	AT3G25950	2,9	down	AT4G13180
2,7	down	AT1G10880	2,8	down	AT3G49130	2,9	down	TA32377_3702
2,7	down	AT1G13110	2,8	down	TA26614_3702	2,9	down	AT3G02610
2,7	down	AT1G01010	2,8	down	AT2G03980	2,9	down	AT2G04050
2,7	down	AT3G49110	2,8	down	AT3G15460	2,9	down	AT5G66270
2,7	down	AT3G58360	2,8	down	AT4G19120	2,9	down	AT1G76680
2,7	down	AT3G63370	2,8	down	AT2G03530	2,9	down	AT5G43650
2,7	down	ATMG00260	2,8	down	AA605363	2,9	down	AT5G20550
2,7	down	AT5G43630	2,8	down	AT1G64170	2,9	down	AT1G63960
2,7	down	AT2G41070	2,8	down	AT1G05510	2,9	down	AT2G29460
2,7	down	AT2G35760	2,8	down	AT2G25735	2,9	down	NP453168
2,7	down	AT5G40690	2,8	down	AT2G38790	2,9	down	AT2G37420
2,7	down	AT3G26130	2,8	down	AT1G34575	2,9	down	AT1G01380
2,7	down	BX838014	2,8	down	AT1G41920	2,9	down	AT4G06585
2,7	down	AT3G49210	2,8	down	AT4G08850	2,9	down	AT1G69720
2,7	down	AT3G59830	2,8	down	AT4G39650	2,9	down	TC313052
2,7	down	AT5G07110	2,8	down	TA47679_3702	2,9	down	AT3G14700
2,7	down	AT5G36260	2,8	down	AT1G61550	2,9	down	AT3G49970
2,7	down	AT5G43170	2,8	down	AT1G10550	2,9	down	AT5G22380
2,7	down	AT5G11210	2,8	down	AT5G60280	2,9	down	AT4G17585
2,7	down	AT2G33006	2,8	down	DQ446320	2,9	down	AT4G11550
2,7	down	AT2G31910	2,8	down	AT4G21865	2,9	down	AT1G53480
2,7	down	AT1G70250	2,8	down	AT3G05950	2,9	down	AT4G08555
2,7	down	AT4G22510	2,8	down	AT1G32960	2,9	down	AT1G69530
2,7	down	AT5G41160	2,8	down	AT4G14650	2,9	down	AT4G29700
2,7	down	AT4G11170	2,8	down	AT2G47520	2,9	down	AT5G61270
2,7	down	AT1G11340	2,8	down	TA45274_3702	2,9	down	AT4G13660

5. Anhang

2,9	down	TC297242	3,1	down	AT2G45210	3,2	down	AT5G24290
2,9	down	AT4G32490	3,1	down	AT5G05040	3,2	down	AT1G76360
2,9	down	AT2G41570	3,1	down	AT1G65845	3,2	down	AT1G45010
2,9	down	AT1G05300	3,1	down	AT4G20780	3,2	down	AT4G38540
3,0	down	AT3G23320	3,1	down	AT5G61070	3,2	down	AT4G12735
3,0	down	AT4G12350	3,1	down	AT1G58225	3,2	down	AT3G45650
3,0	down	AT3G24540	3,1	down	AT1G66880	3,2	down	AT5G35490
3,0	down	AT1G21100	3,1	down	AT3G11180	3,2	down	AT4G21910
3,0	down	AT2G43000	3,1	down	AT1G11610	3,2	down	AT5G17220
3,0	down	DQ108692	3,1	down	AT1G62180	3,2	down	BP567747
3,0	down	AT1G21310	3,1	down	AT2G15490	3,2	down	AT5G42250
3,0	down	AT2G25000	3,1	down	AT2G23620	3,2	down	AT5G36937
3,0	down	EG518854	3,1	down	AT5G08260	3,2	down	AT3G13080
3,0	down	AT2G16060	3,1	down	AT4G02280	3,2	down	AT5G52750
3,0	down	AT1G52810	3,1	down	AT2G12462	3,2	down	AT5G53110
3,0	down	AT1G61390	3,1	down	BP647834	3,2	down	AT1G59950
3,0	down	AT2G30760	3,1	down	AT1G52910	3,2	down	AT3G15960
3,0	down	AT2G15760	3,1	down	AT1G61255	3,2	down	AT5G07100
3,0	down	EG472359	3,1	down	AT5G67450	3,2	down	AT4G21910
3,0	down	AT4G21745	3,1	down	AT5G41750	3,2	down	AT5G26340
3,0	down	AT1G01340	3,1	down	AT1G64360	3,2	down	AT5G40540
3,0	down	AT4G16930	3,1	down	AT3G12910	3,2	down	AT4G13620
3,0	down	AT3G52430	3,1	down	AT5G27420	3,2	down	AT5G59130
3,0	down	EG484752	3,1	down	AT5G46050	3,2	down	AT1G66780
3,0	down	BP637953	3,1	down	AT4G09647	3,2	down	AT1G36180
3,0	down	BP849794	3,1	down	AT4G08850	3,2	down	AT2G30860
3,0	down	AT1G04770	3,1	down	AT2G35760	3,2	down	AT3G63380
3,0	down	AT3G22370	3,1	down	AT4G21070	3,2	down	AT4G06608
3,0	down	AT4G02280	3,1	down	AT1G23410	3,2	down	AT1G15125
3,0	down	AT4G16740	3,1	down	AT3G44550	3,2	down	AT1G13040
3,0	down	AT1G34440	3,1	down	AT3G49120	3,2	down	AT1G36095
3,0	down	AT3G29030	3,1	down	AT3G49540	3,2	down	TC310419
3,0	down	AT1G61610	3,1	down	AT1G23410	3,2	down	AT2G03130
3,0	down	AT3G47660	3,1	down	AT4G03830	3,3	down	AT5G44580
3,0	down	AT1G03710	3,1	down	AT3G29610	3,3	down	ATMG01060
3,0	down	EG467094	3,1	down	AT3G25200	3,3	down	BP789408
3,0	down	BX824029	3,1	down	AT4G13410	3,3	down	AT4G21120
3,0	down	AT1G03410	3,1	down	AK227527	3,3	down	AT4G01740
3,0	down	TA44221_3702	3,1	down	AT5G20860	3,3	down	AT3G13790
3,0	down	AT4G31000	3,1	down	AT4G38540	3,3	down	AT4G20860
3,0	down	AT1G21250	3,1	down	BP861508	3,3	down	AT2G04170
3,0	down	AT3G49820	3,1	down	AT2G10617	3,3	down	AT1G65800
3,0	down	AT2G30860	3,1	down	AT1G76790	3,3	down	AT1G48000
3,0	down	AT1G77760	3,1	down	AT3G30214	3,3	down	AT2G29110
3,0	down	AT4G22980	3,1	down	AT3G23110	3,3	down	AT3G14280
3,0	down	AT5G37600	3,1	down	AT3G55210	3,3	down	BX816950
3,0	down	AT3G01760	3,1	down	AT2G16890	3,3	down	EG514269
3,0	down	AT1G07160	3,1	down	AT5G54060	3,3	down	TC300664
3,0	down	AT4G18360	3,1	down	AT1G19200	3,3	down	AT5G25640
3,0	down	AT1G61560	3,2	down	AT1G13400	3,3	down	AT1G13750
3,0	down	AT4G13130	3,2	down	AT2G03230	3,3	down	AT3G29690
3,0	down	AT4G39180	3,2	down	AT2G24210	3,3	down	AT5G40540
3,0	down	AT1G30473	3,2	down	AT1G63750	3,3	down	AT5G67340
3,0	down	AT5G63020	3,2	down	AT3G30122	3,3	down	AT3G28600
3,0	down	BP866581	3,2	down	AT3G51660	3,3	down	AT5G47077
3,0	down	AT1G21510	3,2	down	AT3G57780	3,3	down	AT5G37600
3,0	down	AT2G33385	3,2	down	AT4G22590	3,3	down	AT2G43610
3,0	down	AT3G45093	3,2	down	AT3G07620	3,3	down	AT3G47770
3,0	down	AT5G20960	3,2	down	AT1G08120	3,3	down	AT5G40330
3,0	down	AT3G05080	3,2	down	AT5G58670	3,3	down	AT2G43580
3,0	down	AT4G34131	3,2	down	AT2G27690	3,3	down	AT1G17615
3,0	down	AT4G14400	3,2	down	BP783345	3,3	down	AT5G34831
3,0	down	AT1G06645	3,2	down	AT5G62150	3,3	down	AT4G07526
3,0	down	AT1G45010	3,2	down	AT5G25320	3,3	down	AT4G11290
3,0	down	AT1G24150	3,2	down	AT2G16060	3,3	down	AT4G08840
3,0	down	AT1G65880	3,2	down	AT5G60440	3,3	down	AT1G21530
3,0	down	AT4G27480	3,2	down	AT1G72930	3,3	down	AT2G30860
3,1	down	AT4G18170	3,2	down	AT4G21940	3,3	down	AT3G49230
3,1	down	AT3G54420	3,2	down	AT3G11840	3,3	down	AT3G05660

3,3	down	AT3G45800	3,5	down	AT3G07120	3,7	down	AT2G04160
3,3	down	AT3G27300	3,5	down	AT1G74650	3,7	down	AT1G69930
3,3	down	AT4G33050	3,5	down	AT3G09270	3,7	down	AT5G41040
3,3	down	AT2G36090	3,5	down	AT4G02910	3,7	down	AT2G23260
3,3	down	AT3G15950	3,5	down	TA32790_3702	3,7	down	EG497537
3,3	down	AT3G58380	3,5	down	AT4G01750	3,7	down	AT1G65240
3,3	down	AT3G13540	3,5	down	AT1G52800	3,7	down	AT5G65510
3,3	down	AT2G23400	3,5	down	AT5G03640	3,7	down	AT5G24080
3,3	down	AT1G29280	3,5	down	AT1G22600	3,7	down	AT2G18620
3,3	down	AT1G45010	3,5	down	BP602007	3,7	down	AT1G23840
3,3	down	AT3G13080	3,5	down	AT3G52430	3,7	down	AT3G27250
3,4	down	AT4G35010	3,5	down	BP667362	3,7	down	AT4G00970
3,4	down	AT5G53100	3,5	down	AT3G30725	3,7	down	TC284853
3,4	down	AT1G37130	3,5	down	BP599848	3,8	down	AT2G32190
3,4	down	AT4G28850	3,5	down	AT5G38000	3,8	down	AT4G09260
3,4	down	AT5G24290	3,5	down	AT3G13950	3,8	down	AT2G25260
3,4	down	AT5G67340	3,5	down	AT4G01760	3,8	down	AT3G61840
3,4	down	AT2G23100	3,5	down	TA42031_3702	3,8	down	AT1G25460
3,4	down	AT4G04110	3,5	down	AT5G10230	3,8	down	AT4G21920
3,4	down	BX820407	3,5	down	AT4G26470	3,8	down	AT3G42570
3,4	down	AT2G28570	3,5	down	AT2G30840	3,8	down	AT4G34330
3,4	down	AT1G63530	3,5	down	AT2G23200	3,8	down	AT5G41315
3,4	down	AT5G01490	3,5	down	AT2G37520	3,8	down	AT1G63210
3,4	down	AT4G16745	3,5	down	TA25950_3702	3,8	down	AT5G35195
3,4	down	AT1G54700	3,5	down	AT4G08780	3,8	down	NP454661
3,4	down	AT1G14240	3,5	down	AT5G01380	3,8	down	AT5G39820
3,4	down	CD529700	3,5	down	AT3G01580	3,8	down	AT4G25010
3,4	down	AT5G42860	3,5	down	AT3G52561	3,8	down	AT3G16420
3,4	down	AT5G10430	3,6	down	AT3G07600	3,8	down	AT5G38900
3,4	down	AT3G22000	3,6	down	AT2G43060	3,8	down	AT3G25960
3,4	down	AT1G66910	3,6	down	AT4G02330	3,8	down	DR229041
3,4	down	AT5G15130	3,6	down	AT2G41940	3,8	down	TA28507_3702
3,4	down	AT4G25820	3,6	down	AT1G67150	3,8	down	AT3G57540
3,4	down	AT4G39180	3,6	down	AT5G58460	3,8	down	AT3G49551
3,4	down	AT5G61490	3,6	down	AT5G20310	3,8	down	AT1G35230
3,4	down	AT2G32030	3,6	down	AT2G43600	3,8	down	AT3G52700
3,4	down	AV441238	3,6	down	AT3G47540	3,8	down	AT4G28670
3,4	down	AT5G40620	3,6	down	AT5G64120	3,8	down	AV529529
3,4	down	AT5G15940	3,6	down	AT4G04260	3,8	down	AT3G29110
3,4	down	NP221869	3,6	down	AT1G04040	3,8	down	AT5G38320
3,4	down	AT3G44093	3,6	down	AT2G21000	3,8	down	AT2G38940
3,4	down	AV797782	3,6	down	AT4G00970	3,8	down	AT1G17345
3,4	down	AT2G42860	3,6	down	AT1G14120	3,8	down	AT4G00360
3,4	down	AT1G52770	3,6	down	AT4G13480	3,8	down	AT3G26230
3,4	down	AT2G17470	3,6	down	AT5G55340	3,8	down	AT1G30190
3,4	down	AT1G10385	3,6	down	AT2G26390	3,8	down	AT1G30370
3,4	down	AT2G22770	3,6	down	AT4G12320	3,8	down	AT2G02020
3,4	down	AT3G52370	3,6	down	AT5G38310	3,8	down	AT1G74140
3,4	down	AT3G04110	3,6	down	AT5G55893	3,8	down	TA36920_3702
3,4	down	AT1G65090	3,6	down	EG428206	3,8	down	AT5G48000
3,4	down	T42092	3,6	down	AT5G40800	3,9	down	AT3G50740
3,4	down	AT5G38780	3,6	down	AT1G18390	3,9	down	AT2G07820
3,4	down	AT1G80130	3,6	down	BE037582	3,9	down	AT3G45660
3,4	down	AT5G35490	3,7	down	AT3G16420	3,9	down	AT4G21990
3,4	down	AT3G03780	3,7	down	AT1G61360	3,9	down	AT3G44326
3,4	down	AT4G01190	3,7	down	AT5G39020	3,9	down	AT4G37295
3,4	down	AT2G32130	3,7	down	AT2G34020	3,9	down	AT1G65240
3,4	down	AT3G58070	3,7	down	NP453353	3,9	down	AT4G28780
3,4	down	AT4G09070	3,7	down	AT5G64060	3,9	down	AT3G61840
3,4	down	AT5G17000	3,7	down	TA40801_3702	3,9	down	AT2G42350
3,4	down	AT3G23240	3,7	down	AT5G13080	3,9	down	AT1G08430
3,4	down	AT1G21270	3,7	down	AT4G12720	3,9	down	AT1G74650
3,5	down	AT4G25110	3,7	down	AT1G52410	3,9	down	AT4G29050
3,5	down	AT1G07620	3,7	down	AT5G10850	3,9	down	AT2G35980
3,5	down	AT4G20040	3,7	down	AT4G37770	3,9	down	AT2G27370
3,5	down	AT1G54010	3,7	down	AT4G33070	3,9	down	AT4G23140
3,5	down	AT1G34180	3,7	down	AT1G33560	3,9	down	AT3G48580
3,5	down	AT3G49820	3,7	down	AT5G27043	3,9	down	AT2G32020
3,5	down	AT5G43980	3,7	down	TA36353_3702	3,9	down	AT5G02900

5. Anhang

3,9	down	AT3G17050	4,2	down	AT2G09795,2	4,5	down	TA28507_3702
3,9	down	AT5G33175	4,2	down	AT2G24610	4,5	down	AV542946
4,0	down	AT4G14630	4,2	down	AT2G18980	4,5	down	AT1G64400
4,0	down	AT4G18250	4,2	down	AT4G29180	4,6	down	AT2G02680
4,0	down	AT3G50760	4,3	down	AT3G52370	4,6	down	AT3G09440
4,0	down	AT2G41100	4,3	down	AT3G11260	4,6	down	AT4G23250
4,0	down	AT1G80865	4,3	down	AT4G04810	4,6	down	AT3G21830
4,0	down	AT3G51680	4,3	down	AT5G22550	4,6	down	AT4G01700
4,0	down	AT3G16420	4,3	down	AT5G12880	4,6	down	AT1G52030
4,0	down	AT1G67750	4,3	down	AT1G33030	4,6	down	AT5G28913
4,0	down	AT2G20562	4,3	down	AT1G32320	4,6	down	AT5G14730
4,0	down	AT3G12580	4,3	down	AT3G26770	4,6	down	AT2G17040
4,0	down	AT3G18170	4,3	down	AT4G18540	4,6	down	AT1G12940
4,0	down	AT1G37130	4,3	down	AT5G33290	4,6	down	AT3G44350
4,0	down	BX837364	4,3	down	AT4G08770	4,6	down	AT1G01695
4,0	down	AT2G46430	4,3	down	AT1G04180	4,6	down	AT1G18380
4,0	down	AT2G24103	4,3	down	AT1G16260	4,6	down	AT5G35575
4,0	down	AT3G16420	4,3	down	AT1G02220	4,6	down	AT3G28580
4,0	down	AT1G33840	4,3	down	AV796960	4,6	down	AT5G47920
4,0	down	AT5G25970	4,3	down	NP168759	4,6	down	AT3G42910
4,0	down	AT3G15370	4,3	down	AT3G09440	4,6	down	AT1G50560
4,0	down	AT2G41100	4,3	down	AT3G49620	4,6	down	AT1G48090
4,0	down	AT3G19660	4,3	down	AT5G25250	4,6	down	AT1G17020
4,0	down	AT1G08930	4,3	down	AT1G62300	4,6	down	AT5G55420
4,0	down	AT2G47190	4,3	down	AT3G23810	4,6	down	AT4G04610
4,0	down	AT5G24420	4,3	down	AT5G43440	4,7	down	AT5G04630
4,0	down	AT5G49290	4,3	down	AT5G13080	4,7	down	AT4G30140
4,0	down	AT3G49580	4,3	down	AT1G52040	4,7	down	AT3G15240
4,0	down	NP281525	4,3	down	AT1G78030	4,7	down	AT5G47960
4,0	down	AT2G21640	4,4	down	AT4G16820	4,7	down	AT1G36992
4,0	down	AT3G04220	4,4	down	AT1G09170	4,7	down	AT5G26170
4,0	down	AT3G50900	4,4	down	AT1G69920	4,7	down	AT1G06090
4,1	down	AT1G12890	4,4	down	AT4G19970	4,7	down	AT3G42725
4,1	down	AT1G35350	4,4	down	AT4G34320	4,7	down	AT4G25010
4,1	down	AT3G56891	4,4	down	AT1G30730	4,7	down	AT1G03420
4,1	down	AT3G25640	4,4	down	AT4G04293	4,7	down	AT1G74000
4,1	down	AT4G13420	4,4	down	AT3G19430	4,7	down	AT3G15720
4,1	down	AT2G21640	4,4	down	AT1G51850	4,7	down	AT1G65985
4,1	down	AT3G49960	4,4	down	AT4G35700	4,7	down	AT3G59340
4,1	down	AT2G07795	4,4	down	AT2G39710	4,7	down	AT3G14362
4,1	down	NP221653	4,4	down	AT1G55940	4,7	down	AT1G77131
4,1	down	AT1G21520	4,4	down	AT5G48450	4,7	down	AT4G04570
4,1	down	AT2G12462	4,4	down	AT3G47090	4,7	down	AT4G33050
4,1	down	AT5G53100	4,4	down	AT5G17330	4,7	down	AT5G60900
4,1	down	AT4G23110	4,4	down	AT4G15620	4,7	down	AT1G74810
4,1	down	AT3G21680	4,4	down	AT5G44585	4,7	down	AT2G46440
4,1	down	AT5G54400	4,4	down	AT1G73490	4,8	down	AT5G48657
4,1	down	AT1G32420	4,4	down	AT1G77790	4,8	down	AT1G50970
4,1	down	DQ108857	4,4	down	TA27808_3702	4,8	down	AT4G04490
4,1	down	AT3G14850	4,4	down	EG512782	4,8	down	AT1G30700
4,1	down	AT3G15950	4,4	down	AT5G44130	4,8	down	AT5G40010
4,1	down	TA36487_3702	4,4	down	AT4G21960	4,8	down	AT3G50260
4,1	down	AT1G21240	4,4	down	AT1G71890	4,8	down	AT1G54020
4,1	down	AT1G51270	4,4	down	AT2G44370	4,8	down	AT5G60950
4,1	down	AT5G44820	4,4	down	AT1G16130	4,8	down	AT2G43590
4,1	down	AT1G07900	4,4	down	AT3G29410	4,8	down	AT1G74000
4,2	down	AT5G53980	4,5	down	AT5G05340	4,8	down	AT2G40450
4,2	down	AT1G64561	4,5	down	AT5G44480	4,8	down	AT1G17610
4,2	down	EG479048	4,5	down	AT2G43050	4,8	down	AT1G02530
4,2	down	AT2G36760	4,5	down	AT4G25330	4,8	down	AT3G17690
4,2	down	AT4G23170	4,5	down	AT2G46450	4,8	down	AT1G54020
4,2	down	TC296351	4,5	down	AT4G35640	4,8	down	AT5G49290
4,2	down	AT1G63245	4,5	down	AT3G08490	4,8	down	AT1G35320
4,2	down	AT1G35710	4,5	down	AT3G22910	4,8	down	AT4G22505
4,2	down	AT5G37980	4,5	down	AT1G65680	4,8	down	AT5G26170
4,2	down	AT2G39330	4,5	down	AT1G55420	4,9	down	AT5G37960
4,2	down	AT3G29250	4,5	down	AT1G65690	4,9	down	AT1G29660
4,2	down	AT3G09130	4,5	down	AT5G42840	4,9	down	AT4G18350
4,2	down	AT3G13440	4,5	down	AT3G23810	4,9	down	AT1G76640

5. Anhang

4,9	down	AT5G41900	5,2	down	AT1G67330	5,7	down	CD531672
4,9	down	AT1G66360	5,2	down	AT5G65500	5,7	down	AT3G44550
4,9	down	AT5G36737	5,2	down	AT4G39030	5,8	down	AT5G56960
4,9	down	AT2G29500	5,3	down	AT4G27860	5,8	down	AT5G04970
4,9	down	AT3G60420	5,3	down	AT5G01540	5,8	down	AT1G41820
4,9	down	AT3G05660	5,3	down	AT4G26320	5,8	down	TA31696_3702
4,9	down	AT5G02490	5,3	down	EG448123	5,8	down	NP206666
4,9	down	AT2G46140	5,3	down	AT3G48640	5,8	down	AT3G21040
4,9	down	AT3G32172	5,3	down	AT4G01720	5,8	down	AT1G59833
4,9	down	AT4G20860	5,3	down	AT2G43590	5,8	down	AT1G67760
4,9	down	AT1G62560	5,3	down	AT4G15630	5,8	down	AT3G21780
4,9	down	AT2G15480	5,3	down	AT1G09932	5,9	down	AT4G22490
4,9	down	AT5G40990	5,3	down	AT4G29033	5,9	down	AT1G16950
4,9	down	AT2G04100	5,3	down	AT5G15900	5,9	down	AT2G15050
4,9	down	AT5G39410	5,3	down	AT5G23950	5,9	down	AT1G62530
4,9	down	AT5G64000	5,3	down	AT5G01335	5,9	down	AT5G12420
4,9	down	AT2G44290	5,4	down	AT2G42560	5,9	down	AT4G13840
4,9	down	AT2G38152	5,4	down	AT2G19660	5,9	down	AT2G15480
4,9	down	AT1G31290	5,4	down	AT3G20470	5,9	down	AT4G04570
4,9	down	AT3G54800	5,4	down	AT5G58400	6,0	down	TC293104
4,9	down	AT4G23270	5,4	down	AT4G39030	6,0	down	AT3G01600
5,0	down	AT1G49860	5,4	down	AT2G39430	6,0	down	AT5G11410
5,0	down	AT4G37400	5,4	down	AT2G12190	6,0	down	AT1G09176
5,0	down	AT1G76790	5,4	down	AT5G08760	6,0	down	AT1G65490
5,0	down	AT5G45380	5,4	down	AT3G15518	6,0	down	AT5G48290
5,0	down	AT5G53110	5,4	down	AT2G30250	6,0	down	AT5G06760
5,0	down	AT4G28460	5,4	down	AT3G28820	6,0	down	TA44611_3702
5,0	down	TA48534_3702	5,4	down	AT1G80865	6,0	down	AT1G65790
5,1	down	AT5G66640	5,4	down	AT2G38860	6,0	down	AT2G46150
5,1	down	AT5G50610	5,4	down	AT1G74010	6,1	down	AT4G13840
5,1	down	AT1G55010	5,4	down	AT4G08720	6,1	down	AT3G27630
5,1	down	AT4G22960	5,4	down	AT1G14370	6,1	down	AT1G12160
5,1	down	AT5G37940	5,4	down	AT4G09100	6,1	down	AI994784
5,1	down	AT5G45380	5,4	down	AU229359	6,1	down	AT1G71390
5,1	down	AT5G09290	5,4	down	AT1G02930	6,1	down	AT3G29780
5,1	down	AT5G06510	5,4	down	AT5G01870	6,1	down	AT1G21528
5,1	down	AT3G47380	5,5	down	AT3G48720	6,1	down	EG499067
5,1	down	AT2G43510	5,5	down	AT5G39520	6,1	down	AT3G49570
5,1	down	AT2G19590	5,5	down	BP575122	6,1	down	AT4G25000
5,1	down	AT1G28010	5,5	down	AT2G15080	6,1	down	AT2G21550
5,1	down	CB258035	5,5	down	AT4G01010	6,1	down	AT1G17960
5,1	down	AT3G48640	5,5	down	AT3G02480	6,1	down	AT1G31540
5,1	down	AT3G20470	5,5	down	AT1G02930	6,2	down	AT4G13900
5,1	down	AT1G14070	5,5	down	AT2G15050	6,2	down	AT1G06330
5,1	down	AT4G06497	5,5	down	AT1G51620	6,2	down	AT5G42800
5,1	down	AT1G17600	5,5	down	NP214749	6,2	down	AT5G63180
5,1	down	AT4G04990	5,5	down	AT1G66450	6,2	down	AT4G23220
5,1	down	AT1G12805	5,5	down	AT3G25610	6,3	down	AT5G50200
5,1	down	AT2G23010	5,6	down	AT4G19030	6,3	down	AT2G16630
5,1	down	AT2G47550	5,6	down	AT5G39670	6,3	down	AT4G39940
5,1	down	AT2G44460	5,6	down	AT5G26930	6,3	down	AT1G73860
5,1	down	AT2G26410	5,6	down	AT3G14620	6,3	down	AT4G01720
5,1	down	AT3G44300	5,6	down	AT3G48526	6,3	down	AT1G18570
5,1	down	AT3G26210	5,6	down	AT3G05690	6,3	down	AT5G36870
5,1	down	AT1G29540	5,6	down	AT5G44390	6,3	down	AT4G35720
5,1	down	AT3G57460	5,6	down	AT5G22355	6,3	down	AT1G18830
5,2	down	AT1G58390	5,6	down	AT5G01900	6,3	down	AT3G12500
5,2	down	AT4G02380	5,6	down	AT5G25930	6,4	down	AT4G21850
5,2	down	AT3G50930	5,6	down	AT1G12980	6,4	down	AT1G73330
5,2	down	AT5G38320	5,6	down	AT5G42590	6,4	down	AT4G20970
5,2	down	AT5G60470	5,6	down	TA48902_3702	6,4	down	EG524177
5,2	down	AT3G21781	5,6	down	AT5G04660	6,4	down	AT4G36610
5,2	down	AT4G14610	5,7	down	BP780265	6,4	down	AT4G11500
5,2	down	TC298277	5,7	down	TA28146_3702	6,4	down	AT1G60540
5,2	down	TA44692_3702	5,7	down	AT4G24340	6,4	down	AT2G46150
5,2	down	AT1G73805	5,7	down	AT1G09370	6,4	down	AT5G49350
5,2	down	AT3G01120	5,7	down	AT4G23220	6,5	down	AT5G20260
5,2	down	AT4G27860	5,7	down	AT4G39830	6,5	down	AT3G13130
5,2	down	AT4G22960	5,7	down	BX822203	6,5	down	AT1G13520

5. Anhang

6,5	down	AT1G74100	7,6	down	AT5G52760	9,0	down	AT4G23215
6,5	down	AT4G17710	7,6	down	AT1G70440	9,1	down	AT4G09420
6,5	down	AT3G02590	7,6	down	AT1G09500	9,1	down	AT1G17170
6,5	down	AT2G23680	7,6	down	AT4G23230	9,2	down	AT5G22570
6,5	down	AT4G03292	7,6	down	AT1G30720	9,2	down	AT5G44575
6,5	down	AT4G23260	7,6	down	AT1G36680	9,3	down	AT4G27970
6,5	down	AT4G29270	7,6	down	AT2G45570	9,4	down	AT5G59070
6,6	down	AT2G46650	7,6	down	AT1G27570	9,4	down	AT1G65890
6,6	down	AT1G09500	7,6	down	AT3G01600	9,4	down	AT1G24140
6,6	down	BU634771	7,7	down	AT4G21390	9,4	down	AT2G22820
6,6	down	AT3G04510	7,7	down	AT2G24850	9,4	down	AT4G04830
6,6	down	BX832756	7,8	down	AT3G12500	9,4	down	NP230685
6,6	down	AT1G24430	7,8	down	AT3G44970	9,4	down	AT3G28330
6,7	down	AT1G30760	7,8	down	AT5G48850	9,4	down	AT5G40780
6,7	down	AT5G66150	7,8	down	AT5G13210	9,5	down	AT3G26320
6,7	down	AT4G00700	7,8	down	TC311923	9,5	down	AT2G38340
6,7	down	AT2G16630	7,9	down	AT5G22545	9,5	down	AT3G46613
6,7	down	AT2G03630	7,9	down	AT4G14365	9,5	down	AT1G76930
6,7	down	AT5G66660	7,9	down	AT2G04100	9,5	down	AT2G04515
6,7	down	AT2G20800	8,0	down	AT1G09080	9,5	down	AT4G23260
6,7	down	AT1G29720	8,0	down	AT3G61280	9,5	down	CA781146
6,7	down	AT4G30290	8,0	down	AT1G35910	9,6	down	AT1G51790
6,7	down	AT5G57625	8,0	down	AT2G02480	9,6	down	AT2G31865
6,8	down	AT3G22160	8,0	down	AT4G15400	9,6	down	AT2G45760
6,8	down	AT1G29724	8,1	down	AT5G25250	9,7	down	AT1G19610
6,8	down	AT2G47000	8,1	down	AT4G17160	9,7	down	AT4G05030
6,9	down	AT5G63225	8,1	down	AT5G13330	9,7	down	AT4G02180
6,9	down	AT3G23120	8,1	down	AT3G54150	9,7	down	CD534157
6,9	down	AT1G12980	8,1	down	AT5G59540	9,7	down	AT1G45201
6,9	down	AT4G18170	8,1	down	AT4G21830	9,8	down	AT5G47330
6,9	down	AT1G29720	8,2	down	TA52085_3702	9,8	down	AT5G38240
6,9	down	AT1G79400	8,2	down	AT1G51800	9,8	down	AT1G07500
7,0	down	AT1G75040	8,2	down	AT3G59700	9,8	down	AT1G75040
7,0	down	AT5G39030	8,2	down	AT1G43145	9,8	down	AT1G09080
7,0	down	AT4G23160	8,2	down	TC281085	9,9	down	TC295209
7,0	down	AT1G73965	8,3	down	AT3G04210	9,9	down	AT3G50930
7,0	down	AT4G34071	8,3	down	AT2G39200	9,9	down	AT5G24540
7,0	down	AT5G25260	8,4	down	AT3G45730	10,0	down	AT4G20000
7,1	down	AT2G02580	8,4	down	AT4G14370	10,0	down	AT1G20350
7,1	down	AT4G23290	8,4	down	AT3G09410	10,0	down	AT1G56710
7,1	down	AT5G52760	8,4	down	AT2G35670	10,0	down	AT5G10760
7,1	down	BT002460	8,4	down	AT1G09932	10,0	down	AT4G22470
7,1	down	AT5G47990	8,4	down	AT1G69310	10,0	down	AT1G77960
7,1	down	AT1G45191	8,4	down	AT1G60095	10,0	down	AT3G13437
7,1	down	AT4G21850	8,4	down	AT2G33020	10,1	down	AT4G11890
7,1	down	AT4G39500	8,4	down	AT1G71691	10,1	down	AT5G43690
7,2	down	AT4G34300	8,5	down	AT5G54710	10,1	down	AT1G29290
7,2	down	AT4G18540	8,5	down	AT4G13680	10,1	down	AT2G32680
7,2	down	AT5G55450	8,5	down	AA042774	10,1	down	AT4G19515
7,2	down	AT3G14210	8,6	down	AT4G17030	10,2	down	AT1G06100
7,2	down	AT4G17660	8,6	down	AT5G22490	10,2	down	AT1G01680
7,3	down	AT2G25820	8,6	down	AT1G63350	10,3	down	AT5G54700
7,3	down	AF361584	8,6	down	AT4G19520	10,3	down	AT1G22240
7,3	down	AT4G13820	8,7	down	TA40601_3702	10,3	down	AT3G29630
7,3	down	AT4G23200	8,7	down	AT4G35810	10,3	down	AT1G65486
7,3	down	AT5G14490	8,7	down	NP226495	10,3	down	AT4G22880
7,4	down	AT2G02250	8,7	down	AT5G43420	10,3	down	AT2G30750
7,4	down	AT5G54720	8,8	down	AT4G25930	10,3	down	AT5G17090
7,4	down	AT5G26220	8,8	down	AT5G44568	10,4	down	AT3G13437
7,4	down	AT5G24110	8,8	down	AT1G78410	10,4	down	EG503888
7,4	down	AT1G69310	8,8	down	AT2G24010	10,4	down	AT5G38250
7,5	down	AT2G32140	8,9	down	AT3G28210	10,5	down	AT1G15630
7,5	down	AT5G64790	8,9	down	AT3G02810	10,5	down	AT1G55240
7,5	down	AT3G18470	8,9	down	AT4G19520	10,5	down	AT3G20370
7,5	down	AT1G60270	9,0	down	AT1G53830	10,6	down	AT1G41850
7,5	down	AT3G29060	9,0	down	AT4G23230	10,6	down	AT3G48340
7,5	down	AT3G20975	9,0	down	AT4G25810	10,7	down	AT1G20180
7,5	down	AT2G43620	9,0	down	AT2G33080	10,7	down	AT2G19590
7,5	down	AT1G76965	9,0	down	AT4G22020	10,7	down	AT4G06569

5. Anhang

10,7	down	AT5G55150	14,3	down	AT2G02990	24,5	down	AT3G45960
10,7	down	AT5G22660	14,5	down	AT5G38340	25,4	down	AT4G39950
10,8	down	AT5G55270	14,6	down	AT5G22570	25,8	down	AT3G57240
10,8	down	AT4G11890	14,6	down	AT4G21840	27,2	down	AT4G39950
10,8	down	AT2G38530	14,6	down	AT2G44370	27,4	down	AT5G45840
10,8	down	AT5G41720	14,7	down	AT5G53240	27,7	down	EG436514
10,8	down	AT2G40170	14,7	down	AT3G60470	27,8	down	AT3G57260
10,8	down	AT4G04745	14,7	down	TA31008_3702	28,7	down	AT1G63200
10,8	down	AT1G58190	14,7	down	BX816295	29,7	down	AT3G53040
10,9	down	AT1G75300	14,8	down	AT1G70260	29,7	down	AT5G33898
11,0	down	AT2G38530	14,9	down	AT3G20360	30,1	down	AT4G23210
11,0	down	AT4G17030	15,0	down	AT4G38560	32,1	down	BX838823
11,1	down	AT2G18660	15,0	down	AT4G00130	32,3	down	AT1G66920
11,1	down	AT3G25250	15,0	down	AT4G31500	33,9	down	AT3G59220
11,2	down	AT5G38940	15,0	down	AT4G22520	33,9	down	AT5G11110
11,3	down	AT1G78340	15,1	down	AT1G34315	34,2	down	AT2G25470
11,4	down	AT4G23310	15,2	down	AT5G24110	34,7	down	AT3G10440
11,4	down	AT4G11890	15,2	down	AT5G07700	35,7	down	AT3G50770
11,4	down	AT5G10760	15,7	down	AT4G17470	38,6	down	AT5G53230
11,5	down	AT3G10815	15,7	down	AT1G72260	40,5	down	AT4G23260
11,5	down	AT1G23830	15,8	down	AT1G07500	41,1	down	AT4G22517
11,5	down	AT3G50170	15,8	down	AT2G25440	41,5	down	AT5G35660
11,5	down	AT2G20142	15,9	down	AT3G45860	44,7	down	AT4G17660
11,6	down	AT2G02300	16,1	down	AT4G05380	45,5	down	AT3G26470
11,6	down	AT1G58602	16,1	down	AT4G04830	49,4	down	AT5G24660
11,7	down	AT2G18690	16,2	down	AT2G04495	49,9	down	AT1G53540
11,7	down	AT1G11482	16,3	down	AT5G24655	55,2	down	AT1G17180
11,7	down	AT3G43170	16,4	down	AT5G07610	55,2	down	AT2G29350
11,7	down	AT2G24850	16,4	down	AT1G71000	64,2	down	AT2G05440
11,8	down	AT4G20970	16,5	down	AT2G38250	65,1	down	AT4G22513
11,8	down	AT4G22950	16,6	down	AT3G16410	69,3	down	AT4G27670
11,9	down	AT4G04510	16,6	down	AT4G23130	69,4	down	AT5G07610
11,9	down	AT4G22520	16,7	down	AT2G22480	78,2	down	AT4G25200
11,9	down	AT1G66700	16,8	down	AT4G19515	86,1	down	AT1G44130
12,0	down	AT1G18590	16,9	down	AT1G66700	107,5	down	CB253682
12,0	down	AT2G21910	16,9	down	AT4G23160			
12,0	down	AT1G06135	17,0	down	AT2G32680			
12,2	down	AT1G21110	17,1	down	AT5G44220			
12,3	down	NP173972	17,2	down	AT4G36700			
12,5	down	AT5G18470	17,3	down	AT1G66370			
12,5	down	AT2G37430	17,4	down	AT3G48920			
12,6	down	AT4G14650	17,7	down	AT4G04500			
12,6	down	BE522041	17,7	down	AT4G25380			
12,6	down	AT1G65500	17,7	down	AT5G61890			
12,6	down	AT5G35375	17,7	down	AT4G17470			
12,7	down	AT1G72260	18,1	down	AT5G61890			
12,8	down	AT2G29120	18,4	down	AT4G23320			
12,8	down	AT4G10250	18,5	down	AT1G26420			
12,8	down	AT5G13210	18,9	down	AT3G13445			
12,9	down	AT2G30424	19,1	down	AT4G15500			
12,9	down	AT2G18690	19,2	down	AT3G47480			
12,9	down	AT2G43570	19,6	down	AT5G38930			
13,1	down	AT3G28890	19,9	down	AT3G13445			
13,1	down	AT3G29340	20,1	down	AT2G39410			
13,2	down	AT2G45580	20,1	down	EG518275			
13,2	down	AT5G47950	20,2	down	AT1G54980			
13,3	down	AT1G31690	20,7	down	AT1G29860			
13,4	down	AT2G22330	21,0	down	AT1G09090			
13,5	down	AT4G23150	21,2	down	AT3G17520			
13,6	down	AT1G26380	21,8	down	AT5G55490			
13,6	down	AT2G38940	22,2	down	AT1G31390			
13,7	down	AT1G14780	22,4	down	AT4G11490			
13,7	down	AT4G20235	22,6	down	AT1G68290			
13,8	down	AT4G23140	23,1	down	TA52911_3702			
13,8	down	AT3G27400	23,1	down	TA45941_3702			
13,8	down	TC291047	23,8	down	AT1G73810			
14,0	down	AT5G22540	23,8	down	AT5G64110			
14,0	down	AT1G17744	24,0	down	AT1G29715			
14,1	down	AT5G61730	24,2	down	AT4G23280			

5.3. Oligonukleotide

Primer-Name	Primer-Sequenz	Locus	Verwendung
nAP1-F	CAGACCACCCATGTTGAGAAAA	<i>AP1</i>	qRT-PCR
nAP1-R	GCACCAAATCCAGCATCCTT		
nLFY for	TCTCCCAAGAAGGGTTATCTG	<i>LFY</i>	qRT-PCR
nLFY rev	TCTTCATCTTTCCTTGACCTG		
FT-qRT2 F	GATCCAGATGTTCCAAGTCC	<i>FT</i>	qRT-PCR
FT-qRT2 R	ACAATCTCATTGCCAAAGGT		
SOC1-qRT-F	GCCAGCTCCAATATGCAAGATA	<i>SOC1</i>	qRT-PCR
SOC1-qRT-R	CTTCATATTTCAAATGCTGCATATT		
FLC-qRT-F	TTGAACCTGTGGATAGCAAGCTT	<i>FLC</i>	qRT-PCR
FLC-qRT-R	CGGTCTTCTGGCTCTAGTCA		
eIF4A-F	TTCGCTCTTCTCTTTGCTCTC	<i>eIF4A</i>	qRT-PCR
eIF4A-R	GAATCATCTTGTCCCTCAAGTA		
CAL1 F	TCAAGATCGTCGTTATCTCTCTTG	<i>cal-6</i>	Genotypisierung
CAL1 R	TTTCTTACAAATCCATGCCACT		
ibm1-12F	AACCTGCAACCGTTTGATCC	<i>ibm1-12</i>	Genotypisierung
ibm1-12R	CCGGTCTGTAACCAATGATTC		
ibm1-11F	CATCCATGCTTGGACACTTG	<i>ibm1-11</i>	Genotypisierung
ibm1-11R	AAGGCAACAGCTAAGGCAGA		
ibm1-5F	ACCCTTCTCTGTGGAAAGCA	<i>ibm1-5</i>	Genotypisierung
ibm1-5R	GCCAGAAGGGAAAAACATGA		
cmt for	GTGGGAAGAATCCAAACGA	<i>cmt3</i>	Genotypisierung
cmt rev	TCATCAACAATCGCACGTCT		
ft-107-F	CCACGCTTTCCTTTTCTCTG	<i>ft-13</i>	Genotypisierung
ft-107-R	TCGCACTCTCGAAGTTGATTT		
RB4-Flag	TCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC		T-DNA-Nachweis
FLAG-LB	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT		
SALK.LB	TTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGG		
GABI-LB	CTGGGAATGGCGAAATCAAGGCATC		
cFT8-F	CTGCGACTGCGACCTATTTT	<i>FT</i>	ChIP
cFT8-R	GCCACTGTTCTACACGTCCA		
cFT9-F	GTGGCTACCAAGTGGGAGAT	<i>FT</i>	ChIP
cFT9-R	TAACTCGGGTCGGTGAAATC		
cFT12-F	GCTCAAACATGTTGCTCGAA	<i>FT</i>	ChIP
cFT12-R	TGCGATCAGTAAAATACACAGACA		
TA3-F	TGGAATCTCAGGGTCAAGG	<i>TA3</i>	ChIP
TA3-R	CCTTCTGAGGTGAGGGACA		
BONS-3'-F	GCTGAACTTGCGTGATCT	<i>BNS</i>	ChIP
BONS-3'-R	GCCAGGAACAGTTTTGGTTT		
LINE-5'-F	ACTTTAACCGCCTCCAGTT	<i>LINE</i>	ChIP
LINE-5'-R	ATAGGTGGATGTCGCAGACC		
FWA-F	CGCCGCTCTAGGGTTTTT	<i>FWA</i>	ChIP
FWA-R	GCGGCGCAAGATCTGATA		

5. Anhang

cFT4 F	AAAACCTTGTGCAGTTGGAACC	<i>FT</i>	DNA-Meth. McrBC
cFT4 R	ACCATCCTGTGTTGACGTTG		
cFT6 F	CAAAAACGTGAGACGCAAAA	<i>FT</i>	DNA-Meth. McrBC
cFT6 R	TCTGCAACTTAGATTCGCAAAA		
cFT8 F	CTGCGACTGCGACCTATTTT	<i>FT</i>	DNA-Meth. McrBC
cFT8 R	GCCACTGTTCTACACGTCCA		
FT9 F	GCCTTTAAGATACTCTCTGC	<i>FT</i>	DNA-Meth. McrBC
FT9 R	CTTGGGTGTGGGCTTTTTTG		
FT10 F	CAACACAGAGAAACCACTG	<i>FT</i>	DNA-Meth. McrBC
FT10 R	CAGAGAAAAGGAAAGCGTGG		
bsFTex-F	GAAGAAGTTGTTTAAGAAGY	<i>FT</i>	Bisulfit
bsFTex-R	TCTAARTTTCCTATTAAAAAC		
bsBLA-F	GTYGAGAGAGGTATYTTGTTAAAGG	<i>FT</i>	Bisulfit
bsBLA-R	TCTCCAACAACCTCTGCTTACTATAA		
bsLINE-F	TAGTTAGTTTTGGGTTATTATGTGA	<i>LINE</i>	Bisulfit-Kontrolle
bsLINE-R	AAAAAATATCAAAATCAAATTCATT		
meLINE-F	TGTAGCTAGTCCCGGGTTACC	<i>LINE</i>	Bisulfit-Kontrolle
meLINE-R	ACAGGAAGTGTCGGGATCG		
uACT2-F	AATTTTTTTGAGATTTGGAATTTGT	<i>ACTIN2</i>	Bisulfit-Kontrolle
uACT2-R	AAAATAACTTTCTATTCAACATACAAC		
meACT2-F	TCAATTTCCCTTGAGATCTGGAATTC	<i>ACTIN2</i>	Bisulfit-Kontrolle
meACT2-R	AATAGCTTCTGTTCAACGTACGAC		

6. Literatur

- Abe,M., Kobayashi,Y., Yamamoto,S., Daimon,Y., Yamaguchi,A., Ikeda,Y., Ichinoki,H., Notaguchi,M., Goto,K., and Araki,T.** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**:1052-1056.
- Adrian,J., Farrona,S., Reimer,J.J., Albani,M.C., Coupland,G., and Turck,F.** (2010) cis-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**:1425-1440.
- Agger,K., Cloos,P.A., Christensen,J., Pasini,D., Rose,S., Rappsilber,J., Issaeva,I., Canaani,E., Salcini,A.E., and Helin,K.** (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**:731-734.
- Ahn,J.H., Miller,D., Winter,V.J., Banfield,M.J., Lee,J.H., Yoo,S.Y., Henz,S.R., Brady,R.L., and Weigel,D.** (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* **25**:605-614.
- Amasino,R.** (2009) Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biol.* **10**:228.
- Bastow,R., Mylne,J.S., Lister,C., Lippman,Z., Martienssen,R.A., and Dean,C.** (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* **427**:164-167.
- Bernatavichute,Y.V., Zhang,X., Cokus,S., Pellegrini,M., and Jacobsen,S.E.** (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS.One.* **3**:e3156.
- Bestor,T.H.** (1990) DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **326**:179-187.
- Blazquez,M.A., Ahn,J.H., and Weigel,D.** (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nat.Genet.* **33**:168-171.
- Blazquez,M.A., Ferrandiz,C., Madueno,F., and Parcy,F.** (2006) How floral meristems are built. *Plant Mol.Biol.* **60**:855-870.
- Bleecker,A.B. and Patterson,S.E.** (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**:1169-1179.
- Boss,P.K., Bastow,R.M., Mylne,J.S., and Dean,C.** (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* **16 Suppl**:S18-S31.
- Cao,X. and Jacobsen,S.E.** (2002a) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99 Suppl 4**:16491-16498.
- Cao,X. and Jacobsen,S.E.** (2002b) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr.Biol.* **12**:1138-1144.
- Cao,X., Springer,N.M., Muszynski,M.G., Phillips,R.L., Kaeppler,S., and Jacobsen,S.E.** (2000) Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:4979-4984.
- Cerdan,P.D. and Chory,J.** (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**:881-885.
- Chan,S.W., Henderson,I.R., and Jacobsen,S.E.** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat.Rev.Genet.* **6**:351-360.
- Chanvivattana,Y., Bishopp,A., Schubert,D., Stock,C., Moon,Y.H., Sung,Z.R., and Goodrich,J.** (2004) Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development* **131**:5263-5276.

- Coen, E.S. and Meyerowitz, E.M.** (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**:31-37.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E.** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**:215-219.
- Corbesier, L. and Coupland, G.** (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* **57**:3395-3403.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**:462-469.
- de, F.S., Immink, R.G., Kieffer, M., Parenicova, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B., and Angenent, G.C.** (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**:1424-1433.
- Deleris, A., Greenberg, M.V., Ausin, I., Law, R.W., Moissiard, G., Schubert, D., and Jacobsen, S.E.** (2010) Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO Rep.* **11**:950-955.
- Deleris, A., Stroud, H., Bernatavichute, Y., Johnson, E., Klein, G., Schubert, D., and Jacobsen, S.E.** (2012) Loss of the DNA methyltransferase MET1 Induces H3K9 hypermethylation at PcG target genes and redistribution of H3K27 trimethylation to transposons in Arabidopsis thaliana. *PLoS. Genet.* **8**:e1003062.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., and Yanofsky, M.F.** (2004) The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity. *Curr. Biol.* **14**:1935-1940.
- Elkins, J.M., Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Seibel, J.F., Schlemminger, I., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Schofield, C.J.** (2003) Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J. Biol. Chem.* **278**:1802-1806.
- Fan, D., Dai, Y., Wang, X., Wang, Z., He, H., Yang, H., Cao, Y., Deng, X.W., and Ma, L.** (2012) IBM1, a JmjC domain-containing histone demethylase, is involved in the regulation of RNA-directed DNA methylation through the epigenetic control of RDR2 and DCL3 expression in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* **40**:8905-8916.
- Farrona, S., Thorpe, F.L., Engelhorn, J., Adrian, J., Dong, X., Sarid-Krebs, L., Goodrich, J., and Turck, F.** (2011) Tissue-specific expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis is maintained independently of polycomb group protein repression. *Plant Cell* **23**:3204-3214.
- Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., and Yanofsky, M.F.** (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**:725-734.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (1996) Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**:8449-8454.
- Foerster, A.M. and Mittelsten, S.O.** (2010) Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing. *Methods Mol. Biol.* **631**:1-11.
- Francis, N.J. and Kingston, R.E.** (2001) Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:409-421.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L.** (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in

- individual DNA strands.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **89**:1827-1831.
- Gehring,M. and Henikoff,S.** (2007) DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim.Biophys.Acta* **1769**:276-286.
- Goll,M.G. and Bestor,T.H.** (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu.Rev.Biochem.* **74**:481-514.
- Goodrich,J., Puangsomlee,P., Martin,M., Long,D., Meyerowitz,E.M., and Coupland,G.** (1997) A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**:44-51.
- Gowher,H., Leismann,O., and Jeltsch,A.** (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J.* **19**:6918-6923.
- Grbic,B. and Bleecker,A.B.** (1996) An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development* **122**:2395-2403.
- Guittou,A.E. and Berger,F.** (2005) Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int.J.Dev.Biol.* **49**:707-716.
- Hartmann,U., Hohmann,S., Nettesheim,K., Wisman,E., Saedler,H., and Huijser,P.** (2000) Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **21**:351-360.
- He,Y., Michaels,S.D., and Amasino,R.M.** (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* **302**:1751-1754.
- Hempel,F.D., Weigel,D., Mandel,M.A., Ditta,G., Zambryski,P.C., Feldman,L.J., and Yanofsky,M.F.** (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* **124**:3845-3853.
- Hempel,F.D., Welch,D.R., and Feldman,L.J.** (2000) Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends Plant Sci.* **5**:17-21.
- Hetzl,J., Foerster,A.M., Raidl,G., and Mittelsten,S.O.** (2007) CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J.* **51**:526-536.
- Hiraoka,K., Yamaguchi,A., Abe,M., and Araki,T.** (2013) The florigen genes FT and TSF modulate lateral shoot outgrowth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **54**:352-368.
- Hisamatsu,T. and King,R.W.** (2008) The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *J.Exp.Bot.* **59**:3821-3829.
- Hublarova,P., Hrstka,R., Rotterova,P., Rotter,L., Coupkova,M., Badal,V., Nenu-til,R., and Vojtesek,B.** (2009) Prediction of human papillomavirus 16 e6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status. *Int.J.Gynecol.Cancer* **19**:321-325.
- Inagaki,S., Miura-Kamio,A., Nakamura,Y., Lu,F., Cui,X., Cao,X., Kimura,H., Saze,H., and Kakutani,T.** (2010) Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the *Arabidopsis* genome. *EMBO J.* **29**:3496-3506.
- Irish,V.F. and Sussex,I.M.** (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* **2**:741-753.
- Izawa,T., Oikawa,T., Sugiyama,N., Tanisaka,T., Yano,M., and Shimamoto,K.** (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev.* **16**:2006-2020.
- Jackson,J.P., Lindroth,A.M., Cao,X., and Jacobsen,S.E.** (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**:556-560.

- Jacobsen, S.E. and Meyerowitz, E.M.** (1997) Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in Arabidopsis. *Science* **277**:1100-1103.
- Jacobsen, S.E., Sakai, H., Finnegan, E.J., Cao, X., and Meyerowitz, E.M.** (2000) Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **10**:179-186.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901-3907.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D.** (2001) Translating the histone code. *Science* **293**:1074-1080.
- Jeong, J.H., Song, H.R., Ko, J.H., Jeong, Y.M., Kwon, Y.E., Seol, J.H., Amasino, R.M., Noh, B., and Noh, Y.S.** (2009) Repression of FLOWERING LOCUS T chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. *PLoS One.* **4**:e8033.
- Jiang, D., Yang, W., He, Y., and Amasino, R.M.** (2007) Arabidopsis relatives of the human lysine-specific Demethylase 1 repress the expression of FWA and FLOWERING LOCUS C and thus promote the floral transition. *Plant Cell* **19**:2975-2987.
- Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., and Jacobsen, S.E.** (2007) The SRA methylcytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr. Biol.* **17**:379-384.
- 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.** (2003) Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* **163**:1109-1122.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D.** (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**:1962-1965.
- Kempin, S.A., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1995) Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science* **267**:522-525.
- Kim, D.H. and Sung, S.** (2013) Coordination of the vernalization response through a VIN3 and FLC gene family regulatory network in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**:454-469.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y.** (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**:715-727.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T.** (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**:1960-1962.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and van, d., V** (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* **229**:57-66.
- Krizek, B.A. and Fletcher, J.C.** (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat. Rev. Genet.* **6**:688-698.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D.** (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**:2893-2905.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J., and Jenuwein, T.** (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.* **116**:2117-2124.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E.** (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**:204-220.
- Lewis, E.B.** (1978) A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**:565-570.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Mey-**

- erowitz,E., and Yu,H.** (2008) A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev.Cell* **15**:110-120.
- Lindroth,A.M., Cao,X., Jackson,J.P., Zilberman,D., McCallum,C.M., Henikoff,S., and Jacobsen,S.E.** (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**:2077-2080.
- Lister,R., O'Malley,R.C., Tonti-Filippini,J., Gregory,B.D., Berry,C.C., Millar,A.H., and Ecker,J.R.** (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**:523-536.
- Long,J. and Barton,M.K.** (2000) Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. *Dev.Biol.* **218**:341-353.
- Lu,F., Cui,X., Zhang,S., Jenuwein,T., and Cao,X.** (2011) Arabidopsis REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat.Genet.* **43**:715-719.
- Lu,F., Li,G., Cui,X., Liu,C., Wang,X.J., and Cao,X.** (2008) Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. *J.Integr.Plant Biol.* **50**:886-896.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J.** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**:251-260.
- Mandel,M.A., Gustafson-Brown,C., Savidge,B., and Yanofsky,M.F.** (1992) Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature* **360**:273-277.
- Mandel,M.A. and Yanofsky,M.F.** (1995) A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature* **377**:522-524.
- Martienssen,R.A. and Colot,V.** (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**:1070-1074.
- Martin,C. and Zhang,Y.** (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6**:838-849.
- Mathieu,J., Warthmann,N., Kuttner,F., and Schmid,M.** (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Curr.Biol.* **17**:1055-1060.
- Mathieu,O., Probst,A.V., and Paszkowski,J.** (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO J.* **24**:2783-2791.
- Mayfield,J.A., Fiebig,A., Johnstone,S.E., and Preuss,D.** (2001) Gene families from the Arabidopsis thaliana pollen coat proteome. *Science* **292**:2482-2485.
- McConnell,J.R. and Barton,M.K.** (1998) Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**:2935-2942.
- Melzer,S., Lens,F., Gennen,J., Van-neste,S., Rohde,A., and Beeckman,T.** (2008) Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. *Nat.Genet.* **40**:1489-1492.
- Miura,A., Nakamura,M., Inagaki,S., Kobayashi,A., Saze,H., and Kakutani,T.** (2009) An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *EMBO J.* **28**:1078-1086.
- Molinero-Rosales,N., Latorre,A., Jamile-na,M., and Lozano,R.** (2004) SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* **218**:427-434.
- Muller,J., Hart,C.M., Francis,N.J., Vargas,M.L., Sengupta,A., Wild,B., Miller,E.L., O'Connor,M.B., Kingston,R.E., and Simon,J.A.** (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**:197-208.
- Nakano,Y., Steward,N., Sekine,M., Kusano,T., and Sano,H.** (2000) A tobacco

- NtMET1 cDNA encoding a DNA methyltransferase: molecular characterization and abnormal phenotypes of transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol* **41**:448-457.
- Niwa,M., Daimon,Y., Kurotani,K., Higo,A., Pruneda-Paz,J.L., Breton,G., Mitsuda,N., Kay,S.A., Ohme-Takagi,M., Endo,M., and Araki,T.** (2013a) BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**:1228-1242.
- Niwa,M., Endo,M., and Araki,T.** (2013b) Florigen is involved in axillary bud development at multiple stages in Arabidopsis. *Plant Signal.Behav.* **8**.
- Noh,B., Lee,S.H., Kim,H.J., Yi,G., Shin,E.A., Lee,M., Jung,K.J., Doyle,M.R., Amasino,R.M., and Noh,Y.S.** (2004) Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *Plant Cell* **16**:2601-2613.
- Pien,S. and Grossniklaus,U.** (2007) Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim.Biophys.Acta* **1769**:375-382.
- Poduska,B., Humphrey,T., Redweik,A., and Grbic,V.** (2003) The synergistic activation of FLOWERING LOCUS C by FRIGIDA and a new flowering gene AERIAL ROSETTE 1 underlies a novel morphology in Arabidopsis. *Genetics* **163**:1457-1465.
- Ramsahoye,B.H., Biniszkiewicz,D., Lyko,F., Clark,V., Bird,A.P., and Jaenisch,R.** (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:5237-5242.
- Redei,G.P.** (1962) Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* **47**:443-460.
- Rigal,M., Kevei,Z., Pelissier,T., and Mathieu,O.** (2012) DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO J.* **31**:2981-2993.
- Ruiz-Garcia,L., Madueno,F., Wilkinson,M., Haughn,G., Salinas,J., and Martinez-Zapater,J.M.** (1997) Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**:1921-1934.
- Samson,F., Brunaud,V., Balzergue,S., Dubreucq,B., Lepiniec,L., Pelletier,G., Caboche,M., and Lecharny,A.** (2002) FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of Arabidopsis thaliana T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res.* **30**:94-97.
- Saze,H. and Kakutani,T.** (2007) Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO J.* **26**:3641-3652.
- Saze,H., Shiraishi,A., Miura,A., and Kakutani,T.** (2008c) Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science* **319**:462-465.
- Saze,H., Shiraishi,A., Miura,A., and Kakutani,T.** (2008b) Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science* **319**:462-465.
- Saze,H., Shiraishi,A., Miura,A., and Kakutani,T.** (2008a) Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science* **319**:462-465.
- Scholl,R.L., May,S.T., and Ware,D.H.** (2000) Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**:1477-1480.
- Schubert,D., Primavesi,L., Bishopp,A., Roberts,G., Doonan,J., Jenuwein,T., and Goodrich,J.** (2006) Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* **25**:4638-4649.

- Schultz,E.A. and Haughn,G.W.** (1991) LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**:771-781.
- Searle,I.R., Pontes,O., Melnyk,C.W., Smith,L.M., and Baulcombe,D.C.** (2010) JMJ14, a JmjC domain protein, is required for RNA silencing and cell-to-cell movement of an RNA silencing signal in Arabidopsis. *Genes Dev.* **24**:986-991.
- Sheldon,C.C., Rouse,D.T., Finnegan,E.J., Peacock,W.J., and Dennis,E.S.** (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:3753-3758.
- Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A., and Shi,Y.** (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**:941-953.
- Smith,H.M., Ung,N., Lal,S., and Courtier,J.** (2011) Specification of reproductive meristems requires the combined function of SHOOT MERISTEMLESS and floral integrators FLOWERING LOCUS T and FD during Arabidopsis inflorescence development. *J.Exp.Bot.* **62**:583-593.
- Snowden,A.W., Gregory,P.D., Case,C.C., and Pabo,C.O.** (2002) Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. *Curr.Biol.* **12**:2159-2166.
- Soppe,W.J., Jacobsen,S.E., Alonso-Blanco,C., Jackson,J.P., Kakutani,T., Koornneef,M., and Peeters,A.J.** (2000) The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol.Cell* **6**:791-802.
- Srikanth,A. and Schmid,M.** (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol.Life Sci.* **68**:2013-2037.
- Stroud,H., Do,T., Du,J., Zhong,X., Feng,S., Johnson,L., Patel,D.J., and Jacobsen,S.E.** (2014) Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **21**:64-72.
- Suarez-Lopez,P., Wheatley,K., Robson,F., Onouchi,H., Valverde,F., and Coupland,G.** (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**:1116-1120.
- Sung,S. and Amasino,R.M.** (2004) Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**:159-164.
- Sutherland,E., Coe,L., and Raleigh,E.A.** (1992) McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J.Mol.Biol.* **225**:327-348.
- Takada,S. and Goto,K.** (2003) Terminal flower2, an Arabidopsis homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**:2856-2865.
- Taoka,K., Ohki,I., Tsuji,H., Furuuta,K., Hayashi,K., Yanase,T., Yamaguchi,M., Nakashima,C., Purwestri,Y.A., Tamaki,S., Ogaki,Y., Shimada,C., Nakagawa,A., Kojima,C., and Shimamoto,K.** (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**:332-335.
- Theissen,G. and Melzer,R.** (2007) Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Ann.Bot.* **100**:603-619.
- Tooke,F., Ordidge,M., Chiurugwi,T., and Battey,N.** (2005) Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *J.Exp.Bot.* **56**:2587-2599.
- Tsukada,Y., Fang,J., Erdjument-Bromage,H., Warren,M.E., Borchers,C.H., Tempst,P., and Zhang,Y.** (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**:811-816.

- Vermaak,D., Ahmad,K., and Henikoff,S.** (2003) Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**:266-274.
- Wang,Q., Sajja,U., Rosloski,S., Humphrey,T., Kim,M.C., Bomblied,K., Weigel,D., and Grbic,V.** (2007) HUA2 caused natural variation in shoot morphology of *A. thaliana*. *Curr.Biol.* **17**:1513-1519.
- Weigel,D., Alvarez,J., Smyth,D.R., Yanofsky,M.F., and Meyerowitz,E.M.** (1992) LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**:843-859.
- Weigel,D. and Glazebrook,J.** (2009) Dellaporta miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harb.Protoc.* **2009**:db.
- Wigge,P.A., Kim,M.C., Jaeger,K.E., Busch,W., Schmid,M., Lohmann,J.U., and Weigel,D.** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**:1056-1059.
- Woo,H.R., Dittmer,T.A., and Richards,E.J.** (2008) Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS.Genet.* **4**:e1000156.
- Xiao,W., Custard,K.D., Brown,R.C., Lemmon,B.E., Harada,J.J., Goldberg,R.B., and Fischer,R.L.** (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* **18**:805-814.
- Yamaguchi,A., Kobayashi,Y., Goto,K., Abe,M., and Araki,T.** (2005) TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiol* **46**:1175-1189.
- Yamane,K., Toumazou,C., Tsukada,Y., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Wong,J., and Zhang,Y.** (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**:483-495.
- Yang,H., Han,Z., Cao,Y., Fan,D., Li,H., Mo,H., Feng,Y., Liu,L., Wang,Z., Yue,Y., Cui,S., Chen,S., Chai,J., and Ma,L.** (2012) A companion cell-dominant and developmentally regulated H3K4 demethylase controls flowering time in *Arabidopsis* via the repression of FLC expression. *PLoS.Genet.* **8**:e1002664.
- Yu,X., Li,L., Li,L., Guo,M., Chory,J., and Yin,Y.** (2008) Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:7618-7623.
- Zhang,X., Yazaki,J., Sundaresan,A., Cokus,S., Chan,S.W., Chen,H., Henderson,I.R., Shinn,P., Pellegrini,M., Jacobsen,S.E., and Ecker,J.R.** (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**:1189-1201.
- Zhou,X. and Ma,H.** (2008) Evolutionary history of histone demethylase families: distinct evolutionary patterns suggest functional divergence. *BMC.Evol.Biol.* **8**:294.
- Zilberman,D., Gehring,M., Tran,R.K., Ballinger,T., and Henikoff,S.** (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat.Genet.* **39**:61-69.
- Zubko,E., Gentry,M., Kunova,A., and Meyer,P.** (2012) De novo DNA methylation activity of methyltransferase 1 (MET1) partially restores body methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **71**:1029-1037.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich für die großartige Unterstützung bei meinem Doktorvater und Betreuer, Dr. Daniel Schubert. Durch die Schaffung von optimalen Bedingungen in seiner Forschungsgruppe bot er mir die Möglichkeit, meine wissenschaftlichen Kenntnisse und Fähigkeiten zu entwickeln und an einem interessanten und herausfordernden wissenschaftlichen Projekt zu arbeiten. Seine hervorragende persönliche Betreuung half mir dabei, eine kritische Sichtweise zu entwickeln, die für die Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen hilfreich und notwendig ist.

Bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Simon bedanke ich mich herzlich für die sehr hilfreichen Anregungen, konstruktive Kritik und Vorschläge während der Seminare, die immer auf den Kernpunkt der Sache gerichtet waren. Er hat einen wesentlichen Teil dazu beigetragen, mir bei der Ausrichtung des Projekts zu helfen.

Ich danke meinem Arbeitskollegen Dr. Marcel Lafos für die sehr hilfreichen Diskussionen zu meinem Projekt. Nicht selten hat er mich dazu gebracht, die erzielten Ergebnisse zu hinterfragen und weitergehende Experimente zu planen.

Bei Dr. Ralf Müller bedanke ich mich für die Bereitstellung seiner erweiterten Expertise auf den für meine Arbeit relevanten wissenschaftlichen Gebieten.

Zuletzt und doch besonders betonend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung. Es war sehr hilfreich, euch stets hinter meinem Rücken zu wissen. Dr. Yves Igor Jerschow, Dr. Evgeny Idelevich, danke euch dafür, dass ich euere Zielstrebigkeit für mich als Beispiel nehmen konnte. Meinen Eltern, Mark und Larissa, dir, Ilona, und deiner Familie danke ich sehr für euere Unterstützung und vor allem für die Geduld. Wie auch schon bei der Anfertigung meiner Diplomarbeit danke ich am meisten, dir, Babushka, Genesia Melamed. Du bist am meisten dafür verantwortlich, dass ich mir stets hohe Ziele gesteckt habe. Du kannst dir sicher sein, dass in allem was ich tue, immer ein Teil von dir steckt.