



Untersuchungen zur Regulation und Konservierung imprinteter Genexpression in Angiospermen.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nadine Petersen

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. S. SCHOLTEN
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. E. KRANZ
Tag der Disputation: 23. August 2013

Hamburg, den 11. September 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Diese Arbeit wurde an der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz, Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie, durchgeführt und von Herrn PD Dr. Stefan Scholten betreut.

1. Dissertationsgutachter: PD Dr. Stefan Scholten, Universität Hamburg

2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Erhard Kranz, Universität Hamburg

Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
2	TABELLENVERZEICHNIS	VIII
3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
5	EINLEITUNG	1
5.1	Die Befruchtung der Samenpflanzen	1
5.1.1	Differenzierung der Gymnospermen- und Angiospermenbefruchtung.....	1
5.1.2	Entwicklung des weiblichen Gametophyten der Angiospermen.....	2
5.1.3	Entwicklung des männlichen Gametophyten der Angiospermen und doppelte Befruchtung der Ei- und Zentralzelle	2
5.1.4	Embryogenese der Angiospermen	3
5.1.5	Das Produkt der doppelten Befruchtung der Angiospermen: das Endosperm	4
5.2	Imprinting bei Angiospermen und Säugetieren	5
5.2.1	Evolutionärer Ursprung der genomischen Prägung	5
5.2.2	Vorkommen von imprinteten Genen bei Angiospermen und Säugetieren	6
5.2.3	Faktoren zur Regulation imprinteter Gene.....	7
5.2.3.1	Epigenetische Prägung über DNA-Methylierung.....	7
5.2.3.2	Konformationsänderungen des Chromatins durch Histon-Modifikationen.....	11
5.2.3.3	Regulation der Expression durch nicht-codierende RNAs	12
5.2.4	Imprintete Gene aus Mais und <i>Arabidopsis</i>	13
5.3	Evolution.....	14
5.3.1	Definition der Homologie	14
5.3.2	Die evolutionäre Entwicklung der Samenpflanzen	15
6	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....	17
7	MATERIAL UND METHODEN	19
7.1	Materialien	19

Inhaltsverzeichnis

7.1.1	Chemikalien, Enzyme und Geräte.....	19
7.1.2	Oligonukleotide für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Analysen	19
7.1.3	Molekulargewichtsstandard	20
7.1.4	Reaktionskomplettausstattungen (Kits)	20
7.1.5	Vektoren.....	21
7.1.6	<i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> Inzuchtlinien	21
7.1.7	Transgene Pflanzen.....	22
7.2	Methoden	22
7.2.1	Anzucht und Kreuzung von <i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
7.2.2	in vitro Embryo-Kultur (embryo rescue)	23
7.2.3	Biolistischer Gentransfer in Maisembryonen.....	23
7.2.4	Maistransformation über <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
7.2.5	Gewebe- und Zellisolierung mittels Mikro-Präparation	24
7.2.6	Molekularbiologische Standardmethoden.....	25
7.2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe	25
7.2.6.2	Reverse Transkription (RT)	25
7.2.6.3	mRNA-Isolierung und SMART®-cDNA-Synthese.....	26
7.2.6.4	Genomische DNA (gDNA)-Extraktion.....	26
7.2.6.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
7.2.6.6	Klonierung von PCR-Produkten	27
7.2.6.7	Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung	28
7.2.6.8	Sequenzierungen	28
7.2.7	Hairpin-Bisulfit PCR zur Analyse komplementärer DNA-Stränge	28
7.2.8	Identifikation neuer imprinteter Gene in Mais	31
7.2.8.1	Allelspezifische Expressionsanalysen reziproker Maislinien.....	31
7.2.8.2	Identifizierung syntenisch, imprinteter Gene zwischen Reis und Mais.....	31
7.2.8.3	Identifikation putativ imprinteter Gene im Maisembryo.....	32
7.2.9	Untersuchungen zur Regulation des genomischen Imprintings	33
7.2.9.1	<i>MEE1</i> Expressionsanalysen	33
7.2.9.2	Funktionelle Analyse des Gens <i>MEE1</i> über homologe Gene in <i>Arabidopsis</i>	34
7.2.9.3	Untersuchung zur Rolle der Glykosylase <i>DNG105</i> für Imprinting	36
8	ERGEBNISSE.....	38
8.1	Identifikation neuer imprinteter Gene in Mais	38
8.1.1	Untersuchungen zur Konservierung der imprinteten Genregulation zwischen Reis und Mais über syntenisch imprintete Gene	38
8.1.1.1	Identifikation orthologer Gene in Mais zu imprinteten Genen in Reis.....	38

Inhaltsverzeichnis

8.1.1.2	Ergebnisse der allspezifischen Expressionsanalysen zur Identifikation imprinteter Gene in Mais.....	38
8.1.1.3	Vergleichsanalysen der identifizierten Gene zu RNA- Tiefensequenzierungen aus späteren Entwicklungsstadien des Endosperms von Mais.....	40
8.1.1.4	Untersuchungen zur Konservierung imprinteter Gene zwischen Angiospermen.....	41
8.1.1.5	Expressionsprofile der identifizierten imprinteten Maisgene in Gameten und verschiedenen Geweben.....	41
8.1.2	Identifikation putativ imprinteter Gene im Maisembryo	47
8.1.2.1	Ergebnisse der RNA-Tiefensequenzierung im Maisembryo	47
8.1.2.2	Allelspezifische Expressionsanalysen der selektierten putativ imprinteten Gene des Maisembryos	48
8.1.2.3	Analysen zum imprinteten Gen GRMZM2G014119	52
8.2	Untersuchung der Rolle der Glykosylase <i>DNG105</i> aus Mais für Imprinting.....	53
8.2.1	Charakterisierung der <i>DNG105</i> aus Mais	54
8.2.2	Überprüfung der Suppression von <i>DNG105</i> und Genspezifität der RNAi <i>dng105</i> -Sequenz.....	55
8.2.3	Analyse der <i>dng105</i> RNAi-Linie mittels allelspezifischer Expressionsanalysen imprinteter Gene im Maisendosperm.....	57
8.3	Untersuchung zur Regulation der Expression des maternal imprinteten Gens <i>MEE1</i>	61
8.3.1	Untersuchung zur Abhängigkeit der Regulation des Imprintings von <i>MEE1</i> vom genomischen Kontext.....	61
8.3.2	Untersuchungen zur Dynamik der DNA-Methylierung des imprinteten Gens <i>MEE1</i>	64
8.3.3	Funktionelle Analyse durch Insertionsmutanten in <i>Arabidopsis</i> und Überexpression des Gens <i>MEE1</i> in Mais	69
9	DISKUSSION	73
9.1	Syntenisch orthologe Gene in Reis und Mais zeigen eine konservierte Imprinting-Regulation	73
9.2	Untersuchung eines maternal imprinteten Gens in Maisembryo	80
9.3	<i>DNG105</i> aus Mais hat eine Rolle in der Imprinting-Regulation.....	85
9.4	Die Imprinting-Regulation des Gens <i>MEE1</i> ist vom genomischen Kontext abhängig	92
9.5	Die Remethylierung des maternalen <i>MEE1</i> -Allels im Embryo erfolgt über einen schnellen Mechanismus.	93
9.6	Funktioneller Vergleich von <i>MEE1</i> und orthologer Gene in <i>Arabidopsis</i>	97
10	ZUSAMMENFASSUNG	99

Inhaltsverzeichnis

11	LITERATURVERZEICHNIS	101
12	ANHANG	110
12.1	verwendete Oligonukleotide	110
12.2	verwendete Medien, Puffer und Lösungen	117
12.3	<i>DNG105</i> RNAi-Sequenz.....	123
12.4	Zusammenfassung der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken Kreuzungen mit der transgenen Maislinie <i>dng105</i>	124
12.5	Transkript- und Oligonukleotidanalyse zur Identifikation imprinteter Gene im Maisembryo.....	124
12.6	Polymorphismus bzw. Doppelpeak-Position der untersuchten Gene im Maisembryo	125
12.7	Expressionslevel des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Maisgeweben	126
12.8	Expressionsanalysen im Endosperm der transgenen <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> Maispflanzen.....	126
12.9	Nachweis über die Verwendung von cDNA-Proben in den durchgeführten Expressionsanalysen	127
12.10	Imprinting der syntenisch orthologen Gene zwischen Reis und Mais	127
12.11	Paraloge Gene der nicht imprinteten Gene in Mais	128
12.12	Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen der syntenisch orthologen Gene im Maisendosperm	133
12.13	Gespeicherte Daten auf der beiliegenden CD	138
13	DANKSAGUNG	139
14	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	140

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Reaktionskomplettausstattungen.	20
Tabelle 2: Verwendete Vektoren.....	21
Tabelle 3: Verwendete Inzuchtlinien von <i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen.....	22
Tabelle 5: Mittels der RNA-Tiefensequenzierung ausgewählte, putativ imprintete Gene des Maisembryos.	48
Tabelle 6: Mittelwerte der verschiedenen Methylierungskontexte der komplementären Stränge des Gens <i>MEE1</i>	64
Tabelle 7: Zusammenfassung des t-Tests: Zur Analyse, ob ein signifikanter Unterschied ($\alpha < 0.05$) zwischen den maternalen und paternalen Methylierungszuständen in den komplementären Strängen des Gens <i>MEE1</i> vorliegt.....	65
Tabelle 8: Prozentuale Hemimethylierungsrate der vorwiegend methylierten Sequenzen.....	66
Tabelle 9: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	110
Tabelle 10: Tabellarische Zusammenfassung der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken Kreuzungen mit der transgenen Maislinie <i>dng105</i> für die imprinteten Gene <i>MEE1</i> , <i>FIE1</i> , GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052.....	124
Tabelle 11: Zusammenfassung der Transkript- und Oligonukleotidanalyse zur Identifikation imprinteter Gene im Maisembryo	124
Tabelle 12: Zusammenfassung der syntenisch orthologen Gene in Reis und Mais.....	127
Tabelle 13: Paraloge Gene der nicht imprinteten Gene (NIGs) in Mais in 10 dap (Zhang <i>et al.</i> , 2011) und 14 dap (Waters <i>et al.</i> , 2011) Maisgewebe.....	128

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung angiospermer Gametophyten	3
Abbildung 2: Reprogrammierung der Methylierung in Säugetieren.....	10
Abbildung 3: Allgemeiner Mechanismus der RNA-Interferenz.	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung homologer Kategorien.	15
Abbildung 5: Versuchsdurchführung der <i>Hairpin</i> -Bisulfit PCR.....	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung des <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> Konstrukts.	33
Abbildung 7: Schematische Darstellung des <i>35S:hsp70:mee1:GFP</i> Konstrukts.	34
Abbildung 8: Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien in <i>Arabidopsis</i>	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung des <i>dng105</i> RNAi-Konstrukts.	37
Abbildung 10: Gameten- und Gewebespezifische Expressionsprofile der identifizierten imprinteten Gene in Mais.	42
Abbildung 11: Mittels Sekhon <i>et al.</i> , 2011 erstellte Expressionsprofile imprinteter Gene in Mais.	44
Abbildung 12: Chromatogramme der maternal imprinteten Gene im Maisendosperm.	45
Abbildung 13: Chromatogramme der paternal imprinteten Gene im Maisendosperm.	46
Abbildung 14: Intron-Exon-Struktur der lokalisierten Fragmente	50
Abbildung 15: Gegenüberstellung der Gene GRMZM2G014256 und GRMZM2G014119 auf dem Maisgenom.	51
Abbildung 16: Sequenzausschnitte der allelspezifischen Expressionsanalyse der reziproken GRMZM2G014119 Kreuzung in Embryo und Endosperm.	52
Abbildung 17: Expressionsprofil des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Geweben aus Mais.....	53
Abbildung 18: Expressionsprofile der <i>DNG101</i> , <i>DNG102</i> und <i>DNG105</i> aus Mais.	54
Abbildung 19: Transkript-Modell der <i>DNG105</i> aus Mais.	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Expressionsprofil der Glykosylase 105 aus Mais.	55
Abbildung 21: Expressionsanalysen reziproker <i>dng105</i> - und Kontrollkreuzungen in Endosperm. 56	
Abbildung 22: Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken <i>dng105</i> RNAi und Kontrollkreuzung für die imprinteten Gene <i>MEE1</i> , <i>FIE1</i> , GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052.....	60
Abbildung 23: Nachweis der Integration des <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> Konstrukts in Mais.	62
Abbildung 24: Untersuchung der Integration und Expression von <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> in gDNA und cDNA aus Endosperm (6 dap).	63
Abbildung 25: Schematische Darstellung der maternalen und paternalen Methylierungszustände in den komplementären Strängen des Gens <i>MEE1</i> im Maisendosperm.....	67
Abbildung 26: Schematische Darstellung der maternalen und paternalen Methylierungszustände in den komplementären Strängen des Gens <i>MEE1</i> Embryo.	68
Abbildung 27: <i>Arabidopsis</i> Schoten der Doppelmutanten SALK_093234 x SALK_042914 und SALK_093234 x SALK_042914 sowie vom Wildtyp Col-0.	70
Abbildung 28: Nachweis der Integration des <i>35S:hsp70:mee1:GFP</i> Konstrukts in die Maisregenerate.	71
Abbildung 29: Analyse der <i>GFP</i> -Expression in Blatt und Endosperm der transgenen <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> und <i>35S:hsp70:mee1:GFP</i> Pflanzen.	72
Abbildung 30: Schematischer Reaktionsweg der paternal imprinteten Gene und DNG105 in Mais	89
Abbildung 31: Methylierungsprofile von <i>MEE1</i> in Gameten, Embryo, Endosperm und Keimling 94	
Abbildung 32: Detektierte Expressionslevel des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Maisgeweben.....	126
Abbildung 33: Nachweis der <i>mee1:GFP</i> Expression im Endosperm der <i>mee1_{Pro}:mee1:GFP</i> Maispflanze (<i>embryo rescue</i> , F2-Generation).....	126
Abbildung 34: Aktin-PCR der verwendeten cDNA-Proben in den Expressionsanalysen	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: Chromatogramme der bekannten imprinteter Gene <i>FIE1</i> , <i>MEG1</i> und <i>MEE1</i> in Maisendosperm zur Kontrolle.....	133
Abbildung 36: Chromatogramme nicht imprinteter Gene in Maisendosperm zur Kontrolle.....	134
Abbildung 37: Chromatogramme nicht imprinteter Gene.....	135
Abbildung 38: Chromatogramme nicht imprinteter Gene, die in zwei unterschiedlichen Genotypkombinationen nachgewiesen wurden.....	136
Abbildung 39: Chromatogramme eines nicht imprinteten Gens, das in drei unterschiedlichen Genotypkombinationen nachgewiesen wurde.....	137
Abbildung 40: Chromatogramme aus Proben mit einem übereinstimmenden Mischungsverhältnis.	138

4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
Amp.	Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5`-trihosphat
BAC	bacterial artificial chromosomes
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus
CAPS-Assay	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	komplementäre DNA
cm	Centimeter
d	Tage
dap	Tage nach der Bestäubung (days after pollination)
DAS	Tage nach der Aussaat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNG	DNA-Glykosylase
dNTPs	Gemisch aus den Deoxyribonukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP
dsRNA	doppelsträngige RNA
DRM	differentiell methylierte Region
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EMB	Embryo
END	Endosperm
EtOH	Ethanol
for	forward (Oligonukleotid)
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierende Proteine
hpRNA	hairpin RNA
IPTG	Isopropyl-beta-D- thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
kluxh/d	Kilolux-Stunden pro Tag
LiCl	Lithiumchlorid
lx	Lux
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
m	Milli-
M	Molarität; molar
meCG/CG	hemimethylierte Sequenz, CG-Kontext
MEG	maternal exprimiertes Gen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOS	Nopalinsynthase-Transkriptionsterminator aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEG	paternal exprimiertes Gen
RISC	<i>RNA-induced SilencingKomplex</i>
rev	reverse (Oligonucleotid)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNA-Seq	Ribonukleinsäure-Sequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SAM	apikales Sprossmeristem
sec	Sekunden
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMART cDNA	Switching Mechanismus bei 5`Ende des RNA-Templates
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
ÜN	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes-Licht
V	Volt
Vol.	Volumenanteil
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranosid
Σ	Summe

Abkürzungsverzeichnis

Anmerkung: Alle englischsprachigen Ausdrücke, die auch im deutschen gebräuchlich sind wurden kursiv geschrieben. Gen-Namen wurden gemäß der allgemeinen Konvention mit großen, kursiven Buchstaben und Proteinnamen in normaler Schrift geschrieben. Ebenfalls kursiv hervorgehoben wurden die Namen von Mutanten, die in dieser Arbeit nach den betroffenen Genen benannt sind (Meinke & Koornneef, 1997).

5 Einleitung

Zea mays ist eine alte Kulturpflanze aus der Familie der Süßgräser (Poaceae), deren Domestikation vor ca. 10000 Jahren aus dem Gras Teosinte begann. Ursprünglich stammt der Mais aus Zentralamerika. Heute werden fast ausschließlich Hybridsorten verwendet, die in ihrer direkten Nachkommenschaft besonders hohe Erträge liefern. Von allen Getreidearten hat die Unterart *Zea mays subsp. mays* die weltweit höchste Produktionsrate. Die Weltproduktion von Mais lag 2010 bei ca. 820 Mio. Tonnen, von denen ca. 320 Mio. Tonnen in den USA angebaut wurden (Kempken & Kempken, 2012). Obwohl Mais in vielen Regionen wie z.B. Lateinamerika und Afrika ein Grundnahrungsmittel ist, wird das Getreide vor allem als Futterpflanze, zur Ölgewinnung und für industrielle Prozesse wie z.B. für Ethanol-Kraftstoff verwendet. Für Genetiker ist Mais seit Jahrzehnten ein wichtiges pflanzengenetisches Untersuchungsobjekt zur Aufklärung von biologischen- und Entwicklungsprozessen. Zu den vorteilhaften Eigenschaften von Mais zählen eine kurze Generationszeit und viele Nachkommen. Laut aktuellen Untersuchungen sind 32000 Gene auf dem ca. 2,3 Gbp großem Maisgenom bzw. auf 10 Chromosomen lokalisiert (Schnable *et al.*, 2009; Kempken & Kempken, 2012). Als Untersuchungsmodell zur Samenentwicklung werden der Maisembryo und das Maisendosperm verwendet. Die Entstehung der beiden Gewebe und die Charakteristika des Endosperms werden im Folgenden näher erläutert.

5.1 Die Befruchtung der Samenpflanzen

5.1.1 Differenzierung der Gymnospermen- und Angiospermenbefruchtung

Gymnospermen (Nacktsamer) und Angiospermen (Bedecktsamer) unterscheiden sich in ihrer Samenstruktur und in ihrem Befruchtungsprozess. Das gemeinsame Merkmal der Gymnospermen ist, dass sich die Samenanlage mit der Embryosackzelle für den Pollen frei zugänglich auf der Oberfläche der Megasporophylle befindet und der resultierende zygotische Embryo Nährstoffe aus dem umgebenden weiblichen Megagametophytengewebe für das Wachstum und den Reifungsprozess absorbiert (Baroux *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu ist bei den Angiospermen der weibliche Gametophyt, als Ort der Befruchtung, innerhalb des maternalen Sporophytengewebes eingebettet (Gehring *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2008). Dieses dient zum Schutze des Gametophyten, welcher sich nach Befruchtung zur Frucht entwickelt (Baroux *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur tierischen Keimzelle, in der schon während der Embryonalentwicklung die Meiose zur Entwicklung der männlichen und weiblichen Gameten beginnt, müssen pflanzliche Keimzellen noch multizelluläre haploide Gametophyten produzieren. Folglich hat der Lebenszyklus der

Einleitung

blühenden Pflanzen abwechselnd diploide (Sporophyten) und haploide (Gametophyten) Generationen (Scott & Spielman, 2006; Huh *et al.*, 2008).

5.1.2 Entwicklung des weiblichen Gametophyten der Angiospermen

In der weiblichen Gametogenese unterliegt die Megasporenmutterzelle der Meiose, woraus vier haploide Megasporen resultieren (Abbildung 1). Abgesehen von wenigen Ausnahmen (wie z.B. *Allium*, *Fritillaria* und *Adoxa*) überlebt nur eine der Megasporen, wohingegen die verbleibenden Megasporen einem programmierten Zelltod unterliegen (Sitte & Strasburger, 2002; Huh *et al.*, 2008). Die überlebende Megaspore durchläuft weitere Kernteilungen und bildet dabei den multizellulären, haploiden, weiblichen Gametophyten (Mosher & Melnyk, 2010). Bei der am weitesten verbreiteten Art der Embryosackbildung, dem *Polygonum*-Typ welcher aus acht Kernen besteht (Baroux *et al.*, 2002; Mosher & Melnyk, 2010), umgeben sich am mikropylaren und chalazalen Pol des Embryosacks je drei Zellen mit eigenem Plasma und bilden mit einer dünnen Zellwand umhüllte Zellen. Aus den drei am chalazalen Pol lokalisierten Zellen gehen die Antipoden hervor (Sitte & Strasburger, 2002). Von den am mikropylaren Pol lokalisierten Zellen entwickelt sich die mittlere Zelle zur größeren haploiden Eizelle und die beiden anderen zu den Synergiden (Sitte & Strasburger, 2002; Huh *et al.*, 2008). Eine Aufgabe der Synergiden besteht darin, den Pollenschlauch zum weiblichen Gametophyten zu lenken (Higashiyama *et al.*, 2001), während die Eizelle den embryonalen Vorläufer darstellt (Gehring *et al.*, 2004). Eine Besonderheit sind die zwei Polkerne, die während der Zellularisierung zur Mitte des weiblichen Gametophyten wandern, und vor (z.B. *Arabidopsis*) bzw. zum Zeitpunkt der Befruchtung (z.B. Mais) fusionieren (Olsen, 2004) und den diploiden Zentralzellkern bilden (Gehring *et al.*, 2004).

5.1.3 Entwicklung des männlichen Gametophyten der Angiospermen und doppelte Befruchtung der Ei- und Zentralzelle

Die diploiden Pollenmutterzellen durchlaufen im Inneren der Sporangien einer Anthere eine Meiose aus der vier haploide Mikrosporen resultieren (Abbildung 1). Die aus der Meiose hervorgegangen Mikrosporen unterliegen weiteren Mitosen und repräsentieren den reifen männlichen Gametophyten (Campbell *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2008), welcher aus zwei haploiden Spermazellen, die aus der generativen Zelle hervorgegangen sind (Sitte & Strasburger, 2002) und einer vegetativen Zelle (Pollenschlauchzelle) (Gehring *et al.*, 2004) besteht. Nach der Freisetzung des reifen männlichen Gametophyten keimt dieser unter Bildung eines Pollenschlauchs auf dem Stigma der weiblichen Blüte aus (Huh *et al.*, 2008). Der von der vegetativen Zelle gebildete

Einleitung

Pollenschlauch hat einerseits die Funktion, die Spermazellen in die Nähe der Eizelle zu transportieren, zum anderen aber auch eine Verankerungsfunktion und dient als Haustorium der Aufnahme von Nährstoffen für die Entwicklung und das Wachstum des Schlauches (Sitte & Strasburger, 2002). Mithilfe von Peptiden, die vom weiblichen Gametophyten abgesondert werden, wird der Pollenschlauch zum Eiapparat dirigiert (Márton et al., 2012). Dabei dringt der Pollenschlauch über einen Transmissionskanal durch die Mikropyle in die Samenanlage ein und entlässt die zwei Spermazellen. Eine der Spermazellen befruchtet die Eizelle und bildet die diploide Zygote, während die zweite Zelle sich mit den beiden Polkernen vereinigt und im Zentrum der Zentralzelle des Embryosacks einen triploiden ($3n$) Kern bildet, aus dem das Endosperm hervorgeht (Berger, 1999; Baroux *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2008). Diese doppelte Befruchtung der Ei- und Zentralzelle ist das charakteristische Merkmal der Angiospermen (Baroux *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2007).

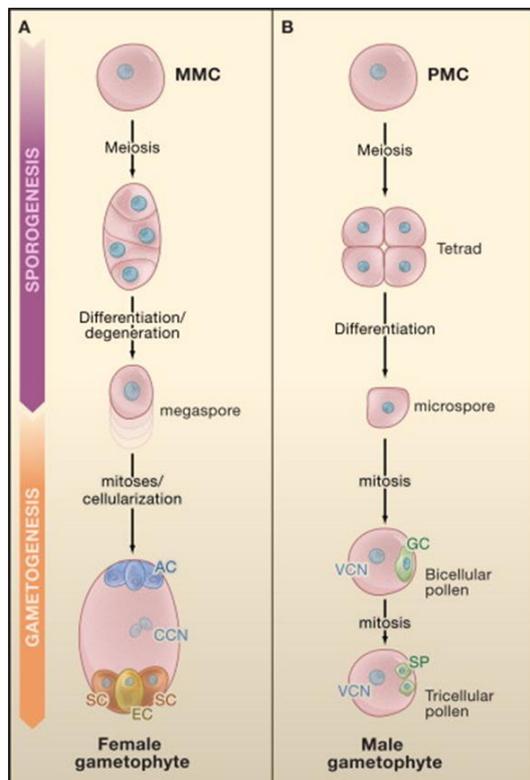


Abbildung 1: Entwicklung angiospermer Gametophyten.

(A) Megasporenmutterzelle (MMC) und Entwicklung des weiblichen Gametophyten. AC, Antipodalzellen ; CCN, Zentralzellen Nukleus; EC, Eizelle; MMC, Megasporenmutterzelle; SC, Synergienzelle.

(B) Pollenmutterzelle (PMC) und Entwicklung des männlichen Gametophyten. GC, Generative Zelle; PMC, Pollenmutterzelle; SP, Spermazelle; VCN, vegetative Zellnukleus. (Huh *et al.*, 2008)

5.1.4 Embryogenese der Angiospermen

Nach Befruchtung der Eizelle teilt sich die daraus resultierende Zygote periklin, infolgedessen gliedert sie sich in eine basale und eine terminale Zelle. Aus der Terminalzelle geht durch weitere Zellteilungen der Embryo hervor, wohingegen der Suspensor sich aus der periklin teilenden Basalzelle entwickelt (Haig & Westoby, 1991; Campbell *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2008). Der Suspensor verankert den Embryo an den Integumenten der Samenanlage und absorbiert während der frühen Embryogenese Nährstoffe aus dem umgebenen weiblichen Gewebe (Huh *et al.*, 2007).

Einleitung

Längs der apikal-basalen Achse erzeugt der Embryo das Hypokotyl, ein Spross- sowie Wurzel-Apikalmeristem und die in unterschiedlicher Zahl vorkommenden Kotyledonen (Campbell *et al.*, 2003). Die meristematischen Gewebe bestehend aus undifferenzierten, totipotenten und teilungsfähigen Zellen, sind den Keimzellen der Tiere ähnlich, sie sind für die Bildung aller Organe der adulten Pflanze verantwortlich (Huh *et al.*, 2008).

5.1.5 Das Produkt der doppelten Befruchtung der Angiospermen: das Endosperm

Vor über hundert Jahren wurde entdeckt, dass das Endosperm ein Produkt der bei Angiospermen auftretenden doppelten Befruchtung ist (reviewed von Sargant, 1900). Es stellt ein Analog der Säugetier Plazenta dar und nährt den sich entwickelnden Embryo, da es reich an Nährstoffen wie Proteinen und Kohlenhydraten ist (Berger, 1999; Huh *et al.*, 2007). Zunächst werden die Nährstoffe im Endosperm gespeichert, jedoch wird diese Speicherfunktion bei vielen Pflanzen mehr oder weniger von den anschwellenden Kotyledonen des Embryos übernommen (Campbell *et al.*, 2003). Das persistente Endosperm der monokotylen Pflanzen wie z.B. Mais, Reis und Weizen speichert Nährstoffe, die vom Keimling nach der Keimung genutzt werden können. Es umfasst den Großteil des reifen Samens. Jedoch kann das Endosperm abhängig von der Pflanzenspezies auch fehlen (z.B. Podostemonaceae), kurz existieren (z.B. Orchidaceae) oder wie bei vielen Dikotylen im reifen Samen fehlen (z.B. Bohne und *Arabidopsis*). Da die Nahrungsreserven des Endosperms zu den Kotyledonen transportiert und durch den sich entwickelnden Embryo absorbiert werden, bevor der Samen seine Entwicklung vollendet hat (Baroux *et al.*, 2002; Feil & Berger, 2007; Sabelli & Larkins, 2009).

Der evolutionäre Ursprung des Endosperms ist bis heute ungeklärt (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2012), obwohl schon vor 100 Jahren Hypothesen aufgestellt wurden, die unter anderem besagen, dass das Endosperm möglicherweise von einem überzähligen Embryo abstammt, der eine Embryo ernährende Funktion erwarb (Friedman, 2001). Eine weitere Hypothese unterstützt die Sexualisierung des weiblichen Gametophyten der Gymnospermen, stimuliert durch ein zweites Befruchtungereignis. Demzufolge das Endosperm der Angiospermen ein Homolog des weiblichen Gametophyten der Gymnospermen ist (Friedman, 2001; Baroux *et al.*, 2002).

Der aus der doppelten Befruchtung resultierende Embryo und das Endosperm sind abgesehen von ihrem Ploidiegrad genetisch identisch (Gehring *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2007), wobei die Entwicklung und Funktion des Endosperms, wie auch die Säugetier Plazenta zum Teil durch genomisches Imprinting reguliert wird (Reik & Walter, 2001; Gehring *et al.*, 2004).

5.2 Imprinting bei Angiospermen und Säugetieren

Genomisches Imprinting ist ein seltenes Phänomen der Genregulation in Angiospermen und Säugetieren. Über die Regulation der imprinteten Gene, insbesondere in Pflanzen, können bisher nur in sehr begrenztem Ausmaß Aussagen gemacht werden. Es wird vermutet, dass dieses unabhängig in Säugetieren und Angiospermen voneinander entstanden ist (Gehring *et al.*, 2004; Scott & Spielman, 2006). Imprinting führt zu einer monoallelischen Expression, bei der Gene entsprechend ihrem elterlichen Ursprung exprimiert werden (Huh *et al.*, 2007). Entdeckt wurde dieses Expressionsmuster in Pflanzen, im Zuge von Analysen eines maternalen Effekts des R-Gens, welches für die Anthocyan-Akkumulation im Aleuron des Maissamens verantwortlich ist (Kermicle, 1970). Imprinting in Säugetieren wurde erst später bei Kern-Transplantations-Experimenten an Mäusen entdeckt (McGrath & Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984).

5.2.1 Evolutionärer Ursprung der genomischen Prägung

Der funktionelle evolutionäre Ursprung des Imprinting-Mechanismus in Angiospermen und Säugetieren wird auf Basis alternativer Modelle diskutiert.

Die am häufigsten erörterte Theorie ist der von Haig und Westoby 1989 formulierte parentale Konflikt (Haig & Westoby, 1989). Die Theorie besagt, dass ein inter-genomischer Konflikt zwischen maternalen und paternalen Genomen über die Zuteilung der Ressourcen von der maternalen Pflanze zum Samen besteht (Haig & Westoby, 1991). Da der maternale Elter seine genetische Information allen Samen vererbt, erhalten alle Nachkommen die gleiche Ressourcenmenge für Wachstum und Entwicklung. Allerdings kommt es zu einer eingeschränkten Ressourcen-Zuteilung von der Mutter zum einzelnen Samen, um das eigene Überleben zu gewährleisten. Der paternale Elter hingegen versucht, die maximale Menge der mütterlichen Ressourcen an seine Nachkommen zu leiten, um den genetischen Fortbestand zu sichern (Gehring *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2008). Die parentale Konflikttheorie wird durch Ergebnisse aus Interploidie-Kreuzungen in *Arabidopsis*, die zu einer verminderten oder verstärkten Embryo- bzw. Endospermentwicklung führten (Scott *et al.*, 1998), sowie durch Mausexperimente bei denen diploide gynogenetische (2m:0p) oder androgenetische (0m:2p) Mausembryonen, welche Entwicklungsstörungen aufwiesen, unterstützt (McGrath & Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984).

Die "Eierstock-Zeitbomben" Theorie vermutet hinter Imprinting eine Strategie zur Verhinderung von Parthenogenese. Dieser Imprinting-Mechanismus bietet demnach einen evolutionären Vorteil durch den Schutz der Mutter vor der Entwicklung parthenogenetischer Embryonen bzw. vor der Entstehung von Teratomen in der Gebärmutter durch unbefruchtete Oocyten. Dementsprechend

Einleitung

werden maternale Allele von wachstumsfördernden Genen inaktiviert oder herunterreguliert während eine paternale Expression für eine erfolgreiche Embryogenese essenziell ist (Varmuza & Mann, 1994). Eine Schwäche dieser Theorie besteht darin, dass sich dadurch lediglich das Imprinting von Genen erklären lässt, die an der Entwicklung des Trophoblasten beteiligt sind (Morison *et al.*, 2005; Graw & Hennig, 2010).

Eine weitere Theorie betrifft Transposons, Pseudogene und repetitive Elemente, deren Inaktivierung durch epigenetische Modifikationen (Ferguson-Smith, 2001), zur evolutionären Entstehung des Imprintings beigetragen haben kann (Barlow, 1993). Das Phänomen wurde zuerst in Mais beobachtet, wo das Allel *B-Bolivia* des *b1* Locus stromaufwärts eine Retrotransposon-ähnliche Sequenz aufweist und im Endosperm imprintet ist, während das verwandte Allel *B-Peru* die Retrotransposon-ähnliche Sequenz nicht enthält und entsprechend keinem Imprinting unterliegt (Selinger & Chandler, 2001).

5.2.2 Vorkommen von imprinteten Genen bei Angiospermen und Säugetieren

Das primäre Model zur Untersuchung von imprinteten Genen in Säugetieren ist die Maus (MacDonald, 2012). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden ungefähr 100 imprintete Gene in der Maus identifiziert, eine Vielzahl weiterer imprinteter Gene werden noch vermutet (Morison *et al.*, 2005; Brideau *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu wurden bis 2011 ungefähr 22 imprintete oder potenziell imprintete Gene in *Arabidopsis* und Mais dokumentiert (Raissig *et al.*, 2011). Es schien als wäre Imprinting in Pflanzen, im Gegensatz zu Säugetieren, ein weitaus selteneres Phänomen. Die Anwendung von genomweiten RNA-Sequenzanalysen zeigte jedoch, dass vermutlich zwischen 100 und 300 Gene einem genspezifischen Imprinting in *Arabidopsis*, Reis und Mais unterliegen (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; McKeown *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Imprinting in Pflanzen nur in dem durch doppelte Befruchtung entstandenen Endosperm jedoch nicht im Embryo vorkommt (Garnier *et al.*, 2008; Huh *et al.*, 2008), während in Säugetieren die allelspezifische Expression sowohl in der Plazenta als auch im Embryo vorliegt (Feil und Berger, 2007). Jedoch wurden 2009 im Embryo von Mais und 2011 im Embryo von Reis die ersten maternal exprimierten Gene entdeckt (Jahnke & Scholten, 2009; Luo *et al.*, 2011).

5.2.3 Faktoren zur Regulation imprinteter Gene

Die epigenetische Kontrolle der Genexpression basiert auf vererbaren Veränderungen des Erbmateriels, ohne dass eine Veränderung der DNA-Sequenz stattgefunden hat. Die epigenetische Kontrolle unterliegt molekularen Prozessen, welche die Transkription unterstützen, blockieren oder bereits existierende Transkripte abbauen (MacDonald, 2012). Die vorherrschenden epigenetischen Mechanismen beinhalten die DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen. Daneben sind in der Regulation von epigenetischen Modifikationen nicht-codierende RNAs beteiligt (Gehring *et al.*, 2004; Feil & Berger, 2007; Huh *et al.*, 2008).

5.2.3.1 Epigenetische Prägung über DNA-Methylierung

Die Regulation imprinteter Gene mittels DNA-Methylierung konnte aufgrund der Asymmetrie zwischen den parental Allelen für einige imprintete Gene in Pflanzen nachgewiesen werden (Gehring *et al.*, 2006; Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006; Kinoshita *et al.*, 2004). Die Cytosin-Methylierung ist mit heterochromatischen Loci inklusive Telomeren und Centromeren assoziiert (Bauer & Fischer, 2011). Die primäre Funktion der DNA-Methylierung ist die Regulation der Transkription und die Stilllegung von transponierbaren genetischen Elementen, um dadurch das Genom vor möglichen negativen Auswirkungen zu schützen (Gehring & Henikoff, 2007). Des Weiteren führt die Methylierung in Säugetieren zur Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen (Huh *et al.*, 2008). Daneben verhindert die DNA-Methylierung die Gentranskription mithilfe multipler Mechanismen z.B. in Promotor-Elementen. Dies geschieht unter anderem durch Blockierung des Zugangs von Transkriptionsfaktoren an die DNA, Rekrutierung von Methyl-CG-Binde-Domäne-Proteinen (MBD) und Bildung von Komplexen mit der Histon-Deacetylase, Histon-Methyltransferase oder Chromatin-remodellierenden Proteinen, woraus hemmende Chromatinstrukturen resultieren (Li, 2002; Huh *et al.*, 2008). Die Mehrheit der imprinteten Gene ist durch Unterschiede in der Methylierung der Cytosine geprägt, die innerhalb von differenziell methylierten Regionen (DMRs) lokalisiert sind (Reik & Walter, 2001; MacDonald, 2012). In Pflanzen und Säugetieren ist Cytosin in erster Linie in dem symmetrischen CG-Dinukleotid-Kontext methyliert (Gehring & Henikoff, 2007). Zur Methylierung im CG-Kontext konnte zusätzlich in Pflanzen eine DNA-Methylierung im CHG- und CHH-Kontext (H steht für Adenin, Cytosin oder Thymin) dokumentiert werden (Henderson *et al.*, 2010).

Die DNA-Methylierung ist ein postreplikativer Prozess. Hierbei wird die Methylgruppe vom S-Adenosyl-Methionin an die 5'-Position des Cytosins mithilfe der DNA-Methyltransferase übertragen. Diese Reaktion wird als „base flipping“ bezeichnet, dabei wird das Cytosin aus dem Verbund der Doppelhelix geschwenkt und interagiert anschließend mit dem Enzym, woraus eine

Einleitung

kovalente Bindung mit dem Methionin resultiert (Roberts & Cheng, 1998). Es werden zwei Methylierungstypen unterschieden: Bei der initialen Methylierung überträgt das Enzym Methylgruppen auf die Cytosine, ohne auf eine Methylierung im komplementären parentalen Strang angewiesen zu sein. Dieser Typ wird als *de novo* Methylierung bezeichnet. Im Gegensatz dazu gewährleistet die Erhaltungsmethylierung die Aufrechterhaltung bereits existierender Methylierungsmuster (Cao & Jacobsen, 2002; Gehring *et al.*, 2004), indem die Methyltransferase den neu synthetisierten „hemimethylierten“ Doppelstrang (meCG/CG) in eine vollständig methylierte DNA überführt (Leonhardt *et al.*, 1992; Genereux *et al.*, 2005). In Säugetieren wird mithilfe der *de novo* Methyltransferase DNMT3a und DNMT3b die Methylgruppe an das Cytosin im CG-Kontext übertragen, während die symmetrische CG-Methylierung nach der DNA-Replikation am neu synthetisierten Strang mittels der DNA-Methyltransferase DNMT1 aufrechterhalten wird (Huh *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* erfolgt die Methylierung des Cytosins ebenfalls mittels dreier Methyltransferasen. Bei der DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1 (MET1) und der DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) in *Arabidopsis* handelt es sich um Homologe der Säugetier DNMT1 und DNMT3 DNA-Methyltransferasen (Kinoshita *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2008). Die Funktion von MET1 ist die Aufrechterhaltung der CG- und CHG-Methylierung durch Erkennung von hemimethylierten Strängen (meCG/GC) und anschließender Methylierung des nicht modifizierten Cytosins an neu synthetisierter DNA (Kankel *et al.*, 2003; Zhu, 2009). Eine weitere Methyltransferase ist die Chromomethylase 3 (CMT3), deren Vorkommen nur in Pflanzen nachgewiesen wurde (Henikoff & Comai, 1998). *cmt3*-Mutanten in *Arabidopsis* zeigen einen Verlust der Methylierung im CHG- und CHH-Sequenzkontext, jedoch nur eine geringe Veränderung bei CG-Dinukleotiden. Somit ist CMT3 für die Methylierung im CHG-Kontext verantwortlich (Bartee, 2001; Lindroth, 2001). DRM2 wird zur *de novo* Methylierung der symmetrischen und asymmetrischen Kontexte benötigt (Cao & Jacobsen, 2002). Da bisher kein Erhaltungsmechanismus der asymmetrischen CHH-Methylierung in *Arabidopsis* nachgewiesen wurde, wird die Methylierung wahrscheinlich ausschließlich mittels der *de novo* Methyltransferase DRM eingerichtet (Zhu, 2009). Mutationen in der *CMT3* oder *DRM* Methyltransferase haben keinen Einfluss auf die Imprinting-Regulation nicht beeinflussten (Kinoshita *et al.*, 2004), wohingegen die DNMT1 homologe Methyltransferase MET1 ein wichtiger Teil des Imprinting-Mechanismus in Pflanzen zu sein scheint (Kinoshita *et al.*, 2004).

Ein Verlust der Cytosin-Methylierung erfolgt in Pflanzen und Säugetieren über die aktive oder passive Demethylierung. Bei der aktiven Demethylierung wird die Methylgruppe enzymatisch mithilfe von DNA-Glykosylasen direkt vom 5-Methylcytosin entfernt. Dieser Vorgang ist unabhängig von der DNA-Replikation. Die passive Demethylierung erfolgt hingegen, wenn die aufrechterhaltenden Methyltransferasen während des Zell-Zyklus inaktiv sind und folglich die

Einleitung

replikationsabhängige Methylierung unterbleibt (Zhu, 2009). In Säugetieren, Pflanzen und Mikroorganismen sind DNA-Glykosylasen am Basenexzisions DNA-Reparatur-Regulationsweg, dem Entfernen modifizierter, beschädigter oder fehlgepaarter Basen, beteiligt (David *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2008). Zu Beginn des Mechanismus erfolgt das enzymabhängige Herausklappen des methylierten Nukleotids aus der Helix. Anschließend löst die DNA-Glykosylase die N-glykosidische Bindung, woraus eine pyrimidin- bzw. purinfreie Stelle resultiert. Dann spaltet eine AP-Endonuklease die zugehörige Zucker-Phosphat-Bindung an der pyrimidin- bzw. purinfreien Stelle und die entstandene Lücke wird mittels einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase aufgefüllt (Huh *et al.*, 2008). Untersuchungen in *Arabidopsis* identifizierten DNA-Glykosylasen, die die DNA-Methylierung unterdrücken und die Genexpression aktivieren (Zhu, 2009). Die in *Arabidopsis* vorkommende DNA-Demethylase DEMETER (DME) verfügt über eine bifunktionelle 5-Methylcytosin DNA-Glykosylase, sowie eine Endonuklease/Lyase Aktivität (Gehring *et al.*, 2006; Zhu, 2009).

Der Lebenszyklus der Säugetiere erfordert, dass das Imprinting innerhalb der Keimbahn in jeder neuen Generation etabliert wird (Abbildung 2) (Graw & Hennig, 2010). Aus Untersuchungen an Mäusen kennt man die „wellenförmige Abfolge“ von DNA-Demethylierung und Methylierung, während der Gametogenese und der frühen Embryonalentwicklung. In den primordialen Geschlechtszellen werden zunächst die Methylierungsmuster des gesamten Genoms der vorangegangenen Generation gelöscht und anschließend mittels *de novo* Methylierung neu gesetzt. Durch das Löschen der vorhandenen Prägung wird eine Reprogrammierung ermöglicht, die das aktuelle Geschlecht widerspiegelt (Reik *et al.*, 2001; Reik & Walter, 2001; Sha, 2008; Graw & Hennig, 2010). Nach der Fusion von Eizelle und Spermium erfolgt im männlichen Vorkern vor der ersten Zellteilung eine aktive Demethylierung. Im weiblichen Vorkern erfolgt die Demethylierung hingegen passiv im Verlauf der ersten Zellteilungen. Eine erneute „wellenförmige Abfolge“ der DNA-Methylierung betrifft beide Genome im frühen Embryo zur Zeit der Implantation. Im Gegensatz dazu sind, aufgrund eines unbekanntes Mechanismus, die imprinteten Gene von der Demethylierung nach der Fertilisation ausgeschlossen, aufgrund eines unbekanntes Mechanismus. In den somatischen Zellen des Embryos sowie dem erwachsenen Organismus wird das Imprinting-Muster aufrechterhalten (Reik *et al.*, 2001; Reik & Walter, 2001; Sha, 2008; 2010).

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass imprintete Gene in Pflanzen nicht reprogrammiert werden, da imprintete Gene nur im Endosperm nachgewiesen wurden, und somit nicht mit in die nächste Generation überführt werden (Gehring *et al.*, 2004; Kinoshita *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2008). Mit der Identifikation des Gens *MEE1* in Mais wurde jedoch ein Gen identifiziert, das eine imprintete Expression im Embryo zeigt, jedoch 10 Tage nach Befruchtung aufgrund einer

Einleitung

Remethylierung stillgelegt wird (Jahnke & Scholten, 2009; Jiang & Kohler, Graw & Hennig, 2010).

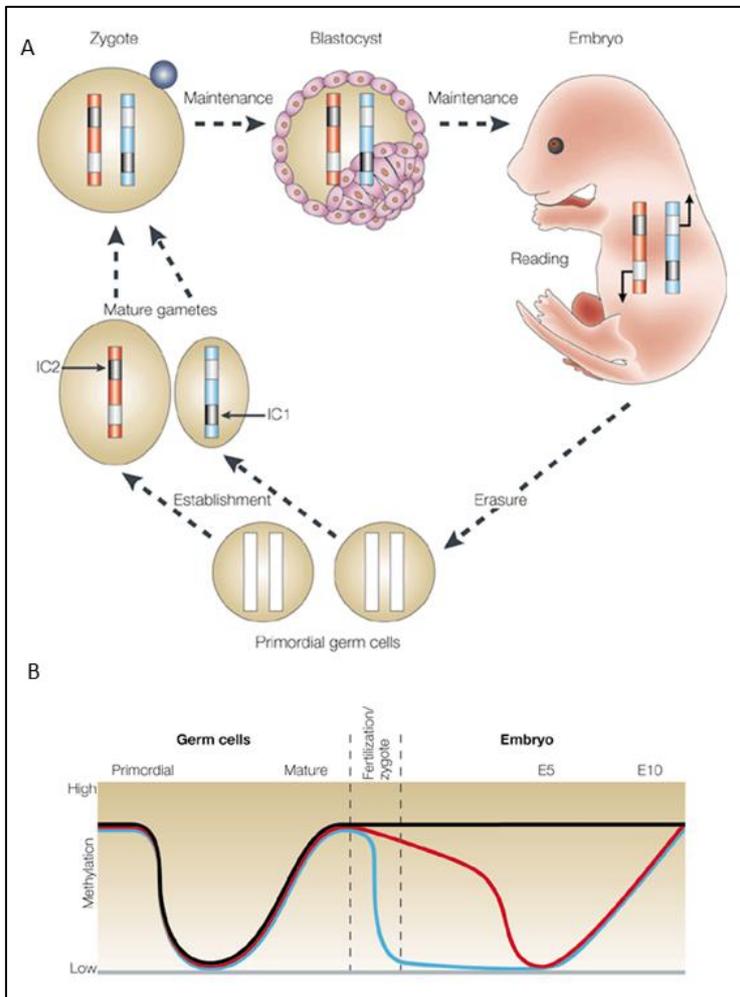


Abbildung 2: Reprogrammierung der Methylierung in Säugetieren.

A: Der Methylierungsstatus der imprinteten Gene während der Embryonalentwicklung und der Keimzellen. Als Beispiel sind die Imprinting Kontrollelemente 1 und 2 gezeigt. Modifikationen an den Zentren sind grau unterlegt, weiß bedeutet „keine Veränderung“. Die elterlichen Chromosomen sind entsprechend ihres Geschlechts gefärbt (rot: weiblich, blau: männlich). Die transkriptionale Interpretation der primären Prägung im sich entwickelnden Embryo ist durch Pfeile am Chromosom dargestellt.

B: Die untere Abbildung zeigt die Methylierungs-Level nicht imprinteter und imprinteter Gene im Vergleich in der Keimzelle und im Embryo. Der Verlauf zeigt die Reprogrammierung von methylierten (schwarz) und nicht methylierten (grau) imprinteten Genen sowie nicht-imprinteten Sequenzen (rot: maternal, blau: paternal) während der Keimzell- und frühen embryonalen Entwicklung. (Abkürzung: E: embryonales Alter) (Reik & Walter, 2001).

Einleitung

5.2.3.2 Konformationsänderungen des Chromatins durch Histon-Modifikationen

In Säugetieren und Pflanzen sind Histon-Modifikationen ebenso wie die DNA-Methylierungen wichtige epigenetische Mechanismen, die an der Genregulation beteiligt sind (He *et al.*, 2011; MacDonald, 2012). Die Grundeinheit des Chromatins sind die Nukleosomen, um die die DNA zur Kondensierung gewunden ist. Ein Nukleosom ist ein Oktamer und besteht aus je zwei Kopien der hoch konservierten basischen Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Gibney & Nolan, 2010; MacDonald, 2012). Das N-terminale Ende des Histons kann mithilfe von Enzymen posttranslational modifiziert werden. Diese Histon-Modifikationen können die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung sowie deren Rückreaktionen umfassen (Gibney & Nolan, 2010; Hamilton, 2011). Die am besten untersuchten Histon-Modifikationen sind die Histon-Acetylierung und Methylierung. Die Acetylierung findet ausschließlich an Lysinen statt und bewirkt die Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins. Die Konsequenz ist eine Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Lysin und den negativen Ladungen an der DNA. Dies führt zu einer Öffnung der Chromatin-Struktur, was das Binden von Transkriptionsfaktoren an die DNA erlaubt, und so die Transkription begünstigt. Die Deacetylierung hingegen geht mit einer Repression der Transkription einher (Li, 2002; Gibney & Nolan, 2010). Eine Histon-Methylierung kann sich in Abhängigkeit von der Position des methylierten Lysins, sowohl positiv als auch negativ auf die Transkription auswirken. So wirken die Methylierung von Histon 3 Lysin 9 (H3K9), Histon 4 Lysin 20 (H4K20) und Histon 3 Lysin 27 (H3K27) reprimierend, wohingegen die Methylierung von Histon 3 Lysin 4 (H3K4) aktivierend auf die Transkription wirkt (Cheung, 2004; Gehring *et al.*, 2004; MacDonald, 2012).

Ein weiterer epigenetischer Faktor der Imprinting-Regulation sind die evolutionär konservierten Polycomb-Gruppen Proteine (PcGs). PcGs bewirken die transkriptionelle Repression imprinteter Gene mittels der Modifikation von Histonen und sind essenzielle Faktoren der Regulation von zellulären Differenzierungsprozessen (Gehring *et al.*, 2004; Hennig & Derkacheva, 2009; Schuettengruber & Cavalli, 2009; He *et al.*, 2011). Studien in *Drosophila* und Vertebraten haben gezeigt, dass PcG-Proteine zwei Hauptkomplexe bilden, den *Polycomb repressive complex 1* und den *Polycomb repressive complex 2* (PRC1 und PRC2). Der PRC1-Komplex katalysiert die Ubiquitylierung des Lysins 119 am Histon H2A (H2AK119ub1), während die Methyltransferase des PRC2-Komplexes die Di- und Trimethylierung des Lysins am Histon H3 (H3K27me3) zur Folge hat. Diese Modifikationen bewirken beide die Ausbildung kompakter, nicht transkriptionell aktiver Chromatinbereiche (Schuettengruber & Cavalli, 2009; Bauer & Fischer, 2011). Der homologe FERTILIZATION INDEPENDENT SEED (FIS)-PRC2 Komplex in *Arabidopsis* wird aus den Untereinheiten MEDEA (MEA), FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2), FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) und den MULTICOPY SUPPRESSOR

Einleitung

OF IRA1 (MSI1) gebildet (Hennig & Derkacheva, 2009; Weinhofer *et al.*, 2010). Der FIS-PRC2 Komplex ist in der Zentralzelle sowie im Endosperm aktiv und ist für eine normale Endospermentwicklung essenziell (Hennig & Derkacheva, 2009; Weinhofer *et al.*, 2010).

5.2.3.3 Regulation der Expression durch nicht-codierende RNAs

Kurze RNAs, die sog. small interfering RNAs (siRNAs), sind an verschiedenen Regulationsmechanismen der Genexpression beteiligt. siRNAs sind ~21-25 Nukleotide lange doppelsträngige RNAs mit 2-nt 3'-Überhängen. Funktionell sind siRNAs in der Lage durch ein post-transkriptionelles Gene Silencing (PTGS) komplementäre Sequenzen zielgerichtet zu degradieren. PTGS ist an der Stilllegung von Gentranskripten, Transposons, sowie transgener oder viraler Sequenzen beteiligt. Ebenfalls wird Gene Silencing in Form der RNA Interferenz (RNAi) zur artifiziellen und gezielten Inaktivierung von zu untersuchenden Genen in verschiedenen Organismen zur funktionellen Analyse genutzt (Abbildung 3) (Baulcombe, 2004; Matranga *et al.*, 2005; Liu, 2006; Carthew & Sontheimer, 2009; Siomi & Siomi, 2009).

siRNA sind ebenfalls an der transkriptionellen Genregulation durch gezielte Genommethylierung über die sog. RNA-vermittelte DNA-Methylierung (RdDM) beteiligt (Chan, 2004; Dalakouras & Wassenegger, 2013). Die Bildung der an RdDM beteiligten siRNAs ist abhängig von der RNA Polymerase Pol IV, die bevorzugt Transkripte von methylierter oder heterochromatischer DNA synthetisiert. Diese einzelsträngige RNA wird mittels der RNA-abhängigen RNA Polymerase 2 (RDR2) zu doppelsträngiger RNA (dsRNA) konvertiert und im Anschluss durch DICER-LIKE 3 (DCL3) in 24-nt siRNAs gespalten. Anschließend bildet eine 24-nt siRNA einen Komplex mit dem ARGONAUTE 4 (AGO4) und der Methyltransferase DRM2. Dieser Komplex wird zu einem der siRNA komplementären, genomischen Sequenz geleitet und ermöglicht der *de novo* Methyltransferase DRM2 die Etablierung der Cytosin-Methylierung (Xie *et al.*, 2004; Zaratiegui *et al.*, 2007; Law & Jacobsen, 2010; He *et al.*, 2011; Wierzbicki *et al.*, 2008; Wassenegger *et al.*, 1994; Waterhouse & Helliwell, 2003).

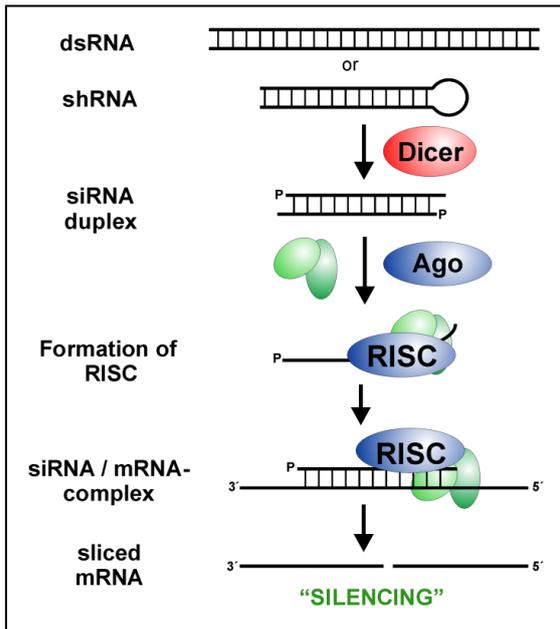


Abbildung 3: Allgemeiner Mechanismus der RNA-Interferenz.

Die anfänglich doppelsträngige RNA (dsRNA) oder short hairpin (shRNA) aus verschiedenen Quellen wird mittels der Nuklease Dicer in kleine, interferierende RNA-Fragmente gespalten. Ein Strang des Doppelstrangs bindet an das Ago-Protein und ermöglicht dadurch eine sequenzspezifische Bindung mit anschließender Spaltung der Ziel-RNA (Graw & Hennig, 2010). (Quelle der Abbildung: <http://www.gene-quantification.de/rnai.html>, 24.04.2013)

5.2.4 Imprintete Gene aus Mais und Arabidopsis

Das genomische Imprinting konnte erst für eine geringe Anzahl imprinteter Gene in *Arabidopsis* und Mais detaillierter untersucht werden. Ein Beispiel ist das maternal imprintete Gen *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* aus *Arabidopsis*, welches für das Homeobox-Leucine Zipper Protein HDG6 codiert (Soppe *et al.*, 2000). Weitere Beispiele maternal imprinteter Gene aus *Arabidopsis* sind die Gene *FIS2* und *MEA*, Untereinheiten des Polycomb-Komplexes FIS-PRC2. Die Histon-Lysine N-Methyltransferase *MEA* ist ein SET-Domäne-enthaltendes Protein, welches ein Homolog des *Drosophila Enhancer of Zeste1* Proteins darstellt (Grossniklaus, 1998). Eine essentielle Rolle der Imprinting-Regulation von *FIS2* und *MEA* bei der Samenentwicklung konnte bereits experimentell gezeigt werden (Grossniklaus, 1998; Luo *et al.*, 2000; Kohler, 2003a; Gehring *et al.*, 2006). Als erstes paternal imprintetes Gen in *Arabidopsis* wurde das, für den Typ-I MADS Box Transkriptionsfaktor *PHERES1 (PHE1)* codierende Gen nachgewiesen (Köhler *et al.*, 2004). Eine potenzielle Funktion von *PHE1* ist die Förderung des Samenwachstums. Die Funktion wäre somit in Übereinstimmung mit der parentalen Konflikttheorie (Kohler, 2003b; Scott & Spielman, 2006). In Mais wurden die maternal imprinteten Gene *FIE1*, *FIE2*, *MEZ1* und *MEE1* detaillierter untersucht. Die Gene *FIE1* und *FIE2* sind Homologe des FIE-Proteins aus *Arabidopsis* und *FIE2* wird im Gegensatz zu *FIE1* in vielen Geweben einschließlich dem Embryo und dem Endosperm in späteren Entwicklungsstadien biallelisch exprimiert (Danilevskaya *et al.*, 2003;

Einleitung

Gutierrez-Marcos *et al.*, 2003; Hermon *et al.*, 2007). Das *MEZ1* (*Enhancer of Zeste1*) Gen codiert für eine putative Histon-Lysine N-Methyltransferase und ist ein Homolog des *Drosophila* PcG Gen *Enhancer of zeste1* und den Genen *MEA*, *CURLY LEAF (CLF)* und *SWINGER (SWN)* aus *Arabidopsis* (Springer *et al.*, 2002). Als erstes imprintetes Gen im Maisembryo und Endosperm wurde das *MATERNALLY EXPRESSED IN EMBRYO 1* Gen (*MEE1*) nachgewiesen (Jahnke & Scholten, 2009).

5.3 Evolution

Ein Großteil der imprinteten Gene zwischen den Säugetierspezies sind hoch konserviert (Graw & Hennig, 2010; Hutter *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu sind die Erkenntnisse über die Konservierung und Evolution der Imprinting-Regulation zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen sehr begrenzt.

5.3.1 Definition der Homologie

Die Homologie bezeugt die gemeinsame evolutionäre Abstammung, die auf die identische genetische Information eines gemeinsamen Vorfahren zurückgeht (Zrzavý *et al.*, 2009). Man unterscheidet hierbei zwei homologe Subkategorien (Koonin, 2005), die historische Homologie auch Orthologie genannt, und die biologische Homologie auch als Paralogie bezeichnet (Abbildung 4) (Zrzavý *et al.*, 2009). Ein Genlocus wird als paralog definiert, wenn er durch eine oder mehrere Genduplikationen mit nachfolgender Differenzierung innerhalb einer Art entstanden ist, wie z.B. die Gene für Hämoglobin und Myoglobin (Koonin, 2005; Zrzavý *et al.*, 2009). Gene in unterschiedlichen Spezies, die von einem gemeinsamen Vorfahren-Gen durch Speziation (Artbildung) evolvierten, werden als ortholog bezeichnet. Die Funktion dieser Gene bleibt in der Regel erhalten wie z.B. das Hämoglobin, welches in allen Säugetieren vorkommt (Koonin, 2005; Zrzavý *et al.*, 2009).

Einleitung

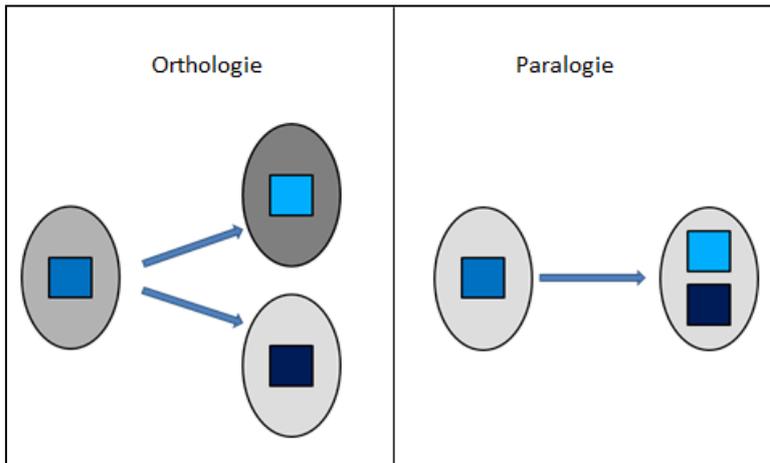


Abbildung 4: Schematische Darstellung homologer Kategorien.

Die Abbildung zeigt die zwei Typen von Homologien: Graue Ovale repräsentieren einzelne Individuen, die Graustufe spiegelt die evolutionäre Linie wider und die Vierecke stellen Merkmale dar.

Die Gene zweier Arten sind ortholog, wenn sie im Laufe der Phylogenese aus demselben Locus eines gemeinsamen Vorfahren durch Artbildung evolvierten. Ein Locus ist paralog, wenn er durch Genduplikation mit nachfolgender Modifikation innerhalb eines Organismus entstanden ist. (Abbildung modifiziert nach Zrzavý *et al.*, 2009)

Die Unterscheidung zwischen orthologen und paralogenen Genen ist für eine funktionelle Annotation der Genome und Rekonstruktion der Genomevolution von Bedeutung (Koonin, 2005). Die Klassifizierung der elementaren Ereignisse der Genevolution umfasst die Speziation und Genduplikation mit anschließender Modifikation, den Genverlust, den horizontalen Gentransfer sowie, die Fusion, Spaltung und Reorganisation von Genen. Wobei die Speziation und die Duplikation als primäre Ereignisse der Genevolution betrachtet werden können (Koonin, 2005).

Der Terminus der Syntenie beschreibt Gemeinsamkeiten in der Reihenfolge von Genen oder Gensegmenten auf demselben Chromosom innerhalb eines Individuums oder einer Spezies. Im Gegensatz dazu definiert die „konservierte Syntenie“ orthologe Gene zwischen verschiedenen Spezies, deren Reihenfolge in der Evolution erhalten blieb (Passarge *et al.*, 1999; Abrouk *et al.*, 2010).

5.3.2 Die evolutionäre Entwicklung der Samenpflanzen

Die Evolution der Samenpflanzen in einem gemeinsamen Vorläufer führte zu der Reduktion des Gametophyten, dem Auftreten von Samen und der Entwicklung von Pollen zu einer Anpassung, durch welche die Reproduktion auf dem Land ermöglicht wurde (Campbell *et al.*, 2003).

Die Samenpflanzen werden in zwei distinkte monophyletische Gruppen unterteilt, den Gymnospermen und Angiospermen. Diese Samenpflanzen haben sich möglicherweise aus einer

Einleitung

ausgestorbenen Pflanzengruppe entwickelt, den sogenannten Progymnospermen. Während des Karbons und frühen Perm führte die adaptive Radiation zur Bildung der verschiedenen Klassen der Gymnospermen (Campbell *et al.*, 2003). Die Reduktion des Gametophyten führte dann zu einer weiteren Diversifizierung, aus der die Angiospermen aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgingen (Friis *et al.*, 2006). Datierungen basierend auf dem Modell einer molekularen Uhr haben zu der Hypothese geführt, dass die Angiospermen vor ca. 300 Millionen Jahren entstanden sind (Sitte & Strasburger, 2002). Heute sind die Angiospermen, die am weitesten verbreitetste und artenreichste Pflanzengruppe. Ihre ungefähre Zahl beläuft sich auf ca. 250.000 rezente Arten, das entspricht ungefähr 90% aller Landpflanzenarten (Campbell *et al.*, 2003). In einer weiteren evolutionären Entwicklung trennten sich vor ca.150-250 Millionen Jahren die Monokotylen (Einkeimblättrige) und Dikotylen (Zweikeimblättrige) der Angiospermen von einem gemeinsamen Vorfahren (Abrouk *et al.*, 2010).

6 Zielsetzung dieser Arbeit

Imprinting ist ein seltenes Phänomen der Genregulation in Angiospermen und Säugetieren. Über die Regulation und Konservierung der imprinteten Gene, insbesondere in Pflanzen, können bisher nur in sehr begrenztem Ausmaß Aussagen gemacht werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung von imprinteten Genen im Maisendosperm. Über die Syntenie sollten orthologe Maisgene zu imprinteten Genen in Reis identifiziert und deren Imprinting-Status ermittelt werden. Weiterhin sollten die Konservierung der Imprinting-Regulation und deren Funktion in monokotylen- und dikotylen-Pflanzen aufgeklärt werden. Es sollten Analysen durchgeführt werden, um festzustellen, in welchen Maisgeweben eine Genexpression der zuvor ermittelten Gene vorliegt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es über eine RNA-Tiefensequenzierung putativ imprintete Gene im Maisembryo zu ermitteln und das Imprinting über eine weitere Methode zu bestätigen. Zur Charakterisierung der als Imprintet identifizierten Gene sollten Analysen verschiedener Expressionszeiträume durchgeführt und die putative Funktion dieser Gene ermittelt werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob im Endosperm ebenfalls eine Imprinting-Regulation vorliegt. Vergleiche mit Datensätzen aus verschiedenen Spezies sollten Aufschluss über eine mögliche konservierte Imprinting-Regulation bei monokotylen- und dikotylen-Pflanzen geben.

In einem anderen Versuch sollte die potenzielle Beteiligung der Glykosylase *DNG105* an der Imprinting-Regulation untersucht werden. Hierzu sollten transgene *DNG105* RNAi-Maislinien erzeugt werden. Ein Nachweis über eine genspezifische Expressionsverminderung der *DNG105* im Endosperm sollte gezeigt werden. Des Weiteren sollte zur Lokalisierung der Glykosylase ein Expressionsprofil in verschiedenen Maisgeweben erstellt werden. Im Endosperm reziproker Kreuzungen sollte die Imprinting-Regulation für mehrere maternal und paternal imprinteten Gene auf eine Veränderung der Regulation untersucht und ein möglicher Mechanismus, der zur Veränderung der Imprinting-Regulation führte, aufgezeigt werden.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Imprinting-Regulation des Gens *MEE1* vom genomischen Kontext, sollte dieses in einen anderen genomischen Kontext überführt werden. Hierzu sollte eine transgene *mee1*:GFP Maislinie generiert werden, die über den endogenen *MEE1*-Promotor reguliert wird. Dazu sollten mikroskopische Untersuchungen und Expressionsanalysen im Endosperm reziproker Kreuzungen durchgeführt werden.

Zielsetzung dieser Arbeit

In einem weiteren Versuch sollte die Dynamik bei der Remethylierung der DNA-Replikation für das imprintete Gens *MEE1* in Endosperm und Embryo untersucht werden. Hierzu sollten die Cytosin-Kontexte komplementärer DNA-Stränge analysiert werden. Es sollte zudem die Hemimethylierungsrate der paternalen und maternalen Allele im Endosperm und Embryo bestimmt werden, um mögliche Unterschiede in der Methylierung nach der Replikation der DNA-Stränge nachzuweisen.

Für eine Analyse, ob der Verlust der Genfunktion des Gens *MEE1* zum Samenabort führt, sollten Doppelmutanten in *Arabidopsis* generiert und auf eine mögliche Entwicklungsstörung untersucht werden. Für eine weitere funktionelle Analyse des Gens *MEE1* sollte eine Überexpressionslinie mit einem Reportergen in Mais erzeugt und über Expressions- und mikroskopischen Analysen der Einfluss auf die Samenentwicklung nachgewiesen werden.

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Geräte und andere Materialien von folgenden Firmen bezogen:

Avegene Life Science (Taipei Hsien, Taiwan); BD Biosciences (New Jersey, USA); Biometra GmbH (Göttingen, D); Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA); Boehringer Ingelheim GmbH (Mannheim, D); Clare Chemical Research, Inc. (Dolores, USA); Clontech Laboratories, Inc. /Takara Bio, Inc Europe (St-Germain-en-Laye, Frankreich); DNA Cloning Service e.K. (Hamburg, D), Eppendorf AG (Hamburg, D); Fermentas über Thermo Scientific Inc. (Waltham, USA); Greiner bio-one GmbH (Kremsmünster, Österreich); Invitrogen über life technologies Corporation (Carlsbad, USA); LGC Genomics GmbH (Hoddesdon, UK); Merck KGaA (Darmstadt, D); Merck Millipore (Merck KGaA) (Billerica, USA); Metabion GmbH (Martinsried, D); New England Biolabs Inc. (Ipswich, USA); Monsanto Company (St. Louis, USA); PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D); Promega Corporation (Fitchburg, USA); Qiagen N.V. (Hilden, D); Retsch GmbH (Haan, D); Roth GmbH & CO. KG (Buchenau, D); Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, USA).

Alle angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Milli-Q Plus Aufbereitungsanlage (Merck Millipore) angesetzt. Dieses aufgereinigte Wasser wird in dieser Arbeit als ddH₂O bezeichnet. Die Sterilisierung erfolgte entweder durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 120 mbar oder mithilfe steriler Spritzenfilter, die eine Porengröße von 0,2 µm aufwiesen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Puffer und sonstigen Lösungen sind im Anhang zusammengestellt.

7.1.2 Oligonukleotide für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Analysen

Zur Auswahl genspezifischer Oligonukleotidsequenzen wurde mithilfe der Internetdatenbank www.maizesequence.org sowie der entsprechenden Mais-Identifikationsnummer die genomische bzw. cDNA-Sequenz ermittelt. Auf Basis dieser Sequenzen wurden die genspezifischen Oligonukleotide mit der frei verfügbaren NCBI Primer 3 BLAST Datenbank

Material und Methoden

(www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) (Ye *et al.*, 2012) unter Verwendung der Standardparameter entworfen. Konnte kein genspezifisches Oligonukleotidpaar identifiziert werden, wurde das entsprechende Gen aus den Analysen ausgeschlossen bzw. in der Syntenie-Tabelle (auf der beiliegenden CD) der imprinteten Gene mit „0 Oligonukleotide“ gekennzeichnet.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Anschließend wurden Stamm- (100 µM) und Arbeitslösungen (10 µM) angesetzt und diese bei -20 °C gelagert. Die Tabelle 9 im Anhang zeigt die Oligonukleotidsequenzen mit ihren Bezeichnungen, der jeweiligen Schmelztemperatur, ihrer Verwendung und der Mais- bzw. *Arabidopsis*-Identifikationsnummer des gewünschten Amplifikationsprodukts.

7.1.3 Molekulargewichtsstandard

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde als Größenstandard der GeneRuler 100 bp Plus oder 1 kb Plus DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet.

7.1.4 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Reaktionskomplettausstattungen.

Reaktionskomplettausstattung	Firma	Verwendung
Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene	Aufreinigung von PCR-Produkten und Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel
Plant Genomic DNA Mini Kit	Avegene	Isolierung genomischer DNA
EpiTect® Plus Bisulfite	Qiagen	Bisulfitkonvertierung
SMART mRNA Amplification Kit	Clontech	SMART® cDNA-Synthese
Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit	Invitrogen	Klonierung von PCR-Fragmenten
pGMT® Easy Vector Systems	Promega	
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific	

7.1.5 Vektoren

Tabelle 2: Verwendete Vektoren.

Name	Ursprung	Verwendung
pGMT® T-Easy	Promega	Klonierungsvektor
pJET 1.2 Cloning Vector	Thermo Scientific	
pBlueSfi BA	DNA Cloning Service	
pMON30049	Monsanto	Expressionsvektor
p7 Lox-int	DNA Cloning Service	binäres Vektorsystem zur Agrobakterien-Transformation
pLNU-SG	DNA Cloning Service	Spacer-GUS (RNAi)

7.1.6 *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* Inzuchtlinien

Tabelle 3: Verwendete Inzuchtlinien von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*.

Organismus	Herkunft	Linie
<i>Zea mays</i>	North Central Regional Plant Introduction Station (NCRPIS), (USA) http://www.ars.usda.gov/main/main.htm	H99 (Accession Number: PI587129)
		B73 (Accession Number: PI550473)
		A188 (Accession Number: Armes 22443)
		Mo17 (Accession Number: PI558532)
		W22 (Accession Number: NSL30053)
		Tex303 (Accession Number: Ames19327)
	zur Verfügung gestellt von A. Melchinger, Universität Hohenheim (Deutschland)	UH005 (M9379, European flint)
		UH301 (M8652, European dent)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc), (UK) http://arabidopsis.info/	Ökotyp, Columbia (Col-0)
		Ökotyp, Landsberg erecta (Ler-0)

7.1.7 Transgene Pflanzen

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Pflanzen.

Organismus	Ursprungslinie	Herkunft	transgene Linie
<i>Zea mays</i>	XH99 (H99 x A188)	diese Arbeit	<i>mee1</i> Promotor: <i>mee1</i> : <i>GFP</i>
			<i>dng105</i> RNAi
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Col-0	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), (UK) http://arabidopsis.info/	SALK_093234.54.45.x (N663350)
			SALK_048394.20.30x (N662388)
			SALK_089888.42.40x (N654294)
			SALK_042914.55.25.x (N662251)
		diese Arbeit	N663350 x N662251
		N662388 x N654294	

7.2 Methoden

7.2.1 Anzucht und Kreuzung von *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*

Die transgenen Maispflanzen *mee1* und *DNG105*, sowie die Inzuchtlinien A188, B73, H99 und Mo17 wurden im Gewächshaus unter Standardbedingungen in Töpfen angezogen. Die Bewässerung erfolgte automatisch drei Mal am Tag und die Lichtstärke wurde durch eine Lichtenanlage gesteuert. Die Beleuchtungsstärke betrug im Winter 230-250 klxh/Tag und im Sommer 400-600 klxh/Tag. Die Lichtenanlage war auf einen Tag/Nacht Wechsel von 16 h Helligkeit und 8 h Dunkelheit eingestellt. Die Temperatur im Gewächshaus betrug am Tag 25 °C und in der Nacht 20 °C. Die Kreuzungen der Maispflanzen verliefen unter kontrollierten Bedingungen. Hierfür wurden die sich entwickelnden Kolben vor dem Erscheinen der Narbenfäden abgedeckt, um eine ungewollte Fremdbestäubung zu vermeiden. Die gezielten Kreuzungen wurden manuell zwischen 9 und 12 Uhr vorgenommen.

Die Maisinzuchtlinien wurden in Hamburg für das Forschungsvorhaben vermehrt. Die verwendeten transgenen Linien und Hybride wurden selbst erzeugt, unter anderem der als XH99 bezeichnete Hybrid A188 x H99, der dem genetischen Hintergrund der transgenen Linien entspricht.

Material und Methoden

Die Anzucht der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen sowie der T-DNA-Insertionslinien erfolgte auf einem Gemisch aus gleichen Teilen Sand und Einheitserde. Nach Erreichen des Vierblattstadiums wurden die Pflanzen pikiert und in Töpfe umgetopft. Die Kultivierung der Pflanzen wurde in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht (Lichtintensität von $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-2}$) sowie darauf folgenden 8 h Dunkelheit bei 22-24 °C und 40-65% Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Zur Kreuzung von *Arabidopsis* wurden ca. 5 Wochen alte Pflanzen verwendet. Alle folgenden Arbeiten wurden am Binokular (SZ40, Olympus K.K., Tokio, Japan) mittels einer Feinpinzette durchgeführt. Die Sepalen, Petalen und Antheren der vollständig geschlossenen Blüten des weiblichen Elter wurden ohne Beschädigung des Karpells entfernt. Anschließend wurden alle sich in der Nähe der zu befruchtenden weiblichen Blüte befindenden Knospen entfernt, um die Selbstung zu verhindern. Nachfolgend wurden reife Staubblätter vollständig geöffneter Blüten des männlichen Elters entnommen und mit der konvexen Seite der Anthere der Pollen auf das Stigma (Narbe) des präparierten weiblichen Elters gestrichen (Salinas, 2006).

7.2.2 *in vitro* Embryo-Kultur (*embryo rescue*)

Um den Zucht-Zyklus zur Erzeugung transgener Nachkommen der Linie *mee1*-Prom.:*mee1*:GFP wurde zu verkürzen, wurde die Embryo-Kultur (*embryo rescue*) (Chawla, 2002) durchgeführt. Der Pollen der transgenen Pflanze wurde zur Bestäubung der Wildtypen A199 oder H99 verwendet und nach 12-14 Tagen die Körner vom Kolben präpariert sowie die Hüllblätter vom Maiskorn entfernt. Anschließend wurden die Maiskörner zur Oberflächensterilisation 20 min in 1% Natriumhypochloridlösung mit 0,1% Mucosol geschwenkt und drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen. Unter sterilen Bedingungen wurde das Korn unter dem Binokular mithilfe von Pinzetten mit der embryonalen Seite nach oben ausgerichtet. Vom Maisstiel Richtung Coleorhiza wurden mit dem Skalpell feine Querscheiben des Gewebes entfernt. Nach jedem Schnitt wurde mittels Skalpell ein leichter Druck auf die Oberfläche ausgeübt, um festzustellen, ob sich der Embryo aus dem Korn herauslöst. Der isolierte Embryo wurde dann mit der Skutellumseite gerichtet auf das MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) überführt und im Licht bei 24°C inkubiert. Nach der Entwicklung des 2-3 Blattstadiums wurden die Pflanzen in Erde überführt.

7.2.3 *Biolistischer Gentransfer in Maisembryonen*

Die Generierung transgener *dng105* RNAi (Abschnitt 7.2.9.1) und *35s:hsp70:mee1*:GFP (Abschnitt 7.2.9.1) Maispflanzen erfolgte mittels einer stabilen biolistischen Transformation. Dazu wurden 10-12 Tage nach Bestäubung (*dap*) die Embryonen (H99xA188) unter sterilen Bedingungen isoliert

Material und Methoden

und wie von Brettschneider (Brettschneider *et al.*, 1997) beschrieben die embryonale Vorkultur, der Beschuss mittels einer Partikelkanone (PDS-1000/He-System, Bio-Rad Laboratories Inc.) und die anschließende Gewebekultur und Selektion transgener Maispflanzen durchgeführt. Infolgedessen wurde Blattmaterial selektierter Pflanzen mittels RNA-Isolation (Abschnitt 7.2.6.1), reverser Transkription (RT) (Abschnitt 7.2.6.2) oder gDNA (Abschnitt 7.2.6.4) und anschließender genspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) (Abschnitt 7.2.6.5) auf die Integration der Konstrukte und Expression hin analysiert.

7.2.4 Maistransformation über *Agrobacterium tumefaciens*

Zur stabilen Transformation des *MEE1:GFP*-Konstrukts wurde die Methode der *Agrobacterium tumefaciens*-Transformation angewandt.

Die zu transformierende DNA (Abschnitt 7.2.9.1) wurde in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien zwischenkloniert und mithilfe einer Restriktion verifiziert. Die Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen und deren Transformation zum Zwecke der folgenden Maistransformation wurde nach dem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (Höfgen & Willmitzer, 1988) durchgeführt. Die Infektion der Maisembryonen (10-12 dap), deren Kultivierung und Selektion wurde nach der Methode von Frame *et al.* (Frame *et al.*, 2011) durchgeführt. Eine Selektion transgener Pflanzen erfolgte nach 2-3 Wochen unter Verwendung des Herbizids Basta® (Bayer CropScience AG, Monheim am Rhein, Deutschland).

7.2.5 Gewebe- und Zellisolierung mittels Mikro-Präparation

Das 5-7 dap isolierte Maisendospermgewebe sowie die für die Transformation verwendeten 10-12 dap Embryonen wurden unter dem Binokular (SZ40, Olympus K.K., Tokio, Japan) mittels Pinzette und Skalpell aus dem Nucellusgewebe der Samenanlage isoliert und in 650 mosmol Mannitollösung gesammelt bzw. direkt auf MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) überführt.

Anschließend wurden die Embryonen manuell mit Hilfe von Glasnadeln unter einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) aus dem 5-7 dap Endosperm präpariert. Beide Gewebe wurden getrennt in Reaktionsgefäßen mit bis zu einer Stückzahl von 10 bis 25 gesammelt. Das isolierte Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung für die molekularen Analysen verwahrt.

Material und Methoden

Die Isolierung von Ei-, Sperma- und Zentralzellen wurde wie von Kranz *et al.* (Kranz *et al.*, 1991; Kranz *et al.*, 1998) mittels der Mikro-Präparationstechnik beschrieben durchgeführt.

7.2.6 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Methoden wie Ethanol-fällung, Restriktion, Phenol-Chloroform Extraktion, Ermittlung von Konzentration und Reinheit isolierter Nukleinsäuren, gelelektrophoretische Auftrennungen, Bakterien-Transformation, sowie die Herstellung allgemeiner Medien und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Bei der Verwendung von Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Herstellerangaben verfahren.

7.2.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde mithilfe eines abgewandelten Protokolls nach Sambrook *et al.* (1989) isoliert. Die Isolierung erfolgte mittels eines Extraktionspuffers (200 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8,8-9,0; 5 mM EDTA pH 8; 1% SDS) gefolgt von einer Chloroform-Phenol Aufreinigung, Lithiumchlorid-Präzipitation und einer Ethanol-Fällung. Zur Beseitigung störender DNA wurden die Proben einer DNaseI- (Thermo Scientific Inc.) Behandlung unterzogen.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf AG) bestimmt und die Qualität der RNA mittels einer denaturierenden, gelelektrophoretischen Auftrennung überprüft.

7.2.6.2 Reverse Transkription (RT)

Die Synthese der *complementary* DNA (cDNA) wurde unter Verwendung der RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Scientific Inc.) entsprechend der Anleitung des Herstellers ausgeführt. Die Reaktion bei 50 °C durchgeführt, wenn das Spacer-spezifische Oligonukleotid verwendet wurde. Die resultierende cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne RNA-Template, um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA bzw. RNA zu detektieren.

Material und Methoden

7.2.6.3 mRNA-Isolierung und SMART®-cDNA-Synthese

Zur Generierung qualitativ hochwertiger doppelsträngiger cDNA aus weniger als 50 ng Gesamt-RNA wurde das Verfahren der SMART-cDNA Technologie (Clontech Laboratories Inc.) verwendet.

Zur Homogenisierung des präparierten Maisembryo- und Endospermgewebes (Abschnitt 7.2.5) wurde dieses in flüssigen Stickstoff schockgefroren und unter Zuhilfenahme einer Schwingmühle (Retsch GmbH) gemörsert. Die Gameten hingegen wurden direkt in die mRNA Isolierung überführt. Die Isolierung der mRNA mit Dynabeads® (Invitrogen) und anschließender cDNA-Synthese wurde wie von Meyer und Lê veröffentlicht (Lê *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2007) mit dem „Template Switch“ Mechanismus ausgeführt. Die auf diese Weise erzeugte SMART-cDNA wurde für PCRs verwendet.

7.2.6.4 Genomische DNA (gDNA)-Extraktion

Die gDNA aus Blattmaterial von Mais und *Arabidopsis* wurde mit der peqGOLD Trifast-Lösung (PEQLAB Biotechnologie GmbH) oder dem Plant Genomic DNA Mini Kit (Avegene Life Science) nach Herstellerangaben extrahiert.

Bei geringem Ausgangsmaterial wie z.B. Endosperm- oder Embryogewebe, wurde eine modifizierte gDNA-Isolierung nach Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. Die gDNA wurde mithilfe des Extraktionspuffers (100 mM Tris HCL pH 8,5; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 30% N-Laurin-Sarcosin) homogenisiert, einer zweimaligen Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen und schließlich mit Ethanol gefällt. Qualität und Konzentration der gDNA wurden im Anschluss photometrisch bestimmt.

7.2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die selektive Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte, RT-PCR Produkt Sequenzierung, Expressionsanalysen, allelspezifische Expressionsanalysen über Polymorphismen sowie der *Arabidopsis* Genotypisierung wurden PCRs durchgeführt.

Die PCRs, wurden mit folgenden Polymerasen durchgeführt: Advantage®2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories Inc.), DCS DNA Polymerase (DNA Cloning Service e.K.), Dream Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific Inc.), Taq Polymerase (Thermo Scientific Inc.) sowie der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific Inc.). Die eingesetzte Templatemenge

Material und Methoden

entsprach bei genomischer DNA 100 ng und bei cDNA 50-100 ng. Bei der *Screening*-PCR wurde von den zu überprüfenden Einzelkolonien ein Teil der Kolonie mit sterilen Zahnstochern in den Reaktionsansatz überführt. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben in 25 µl angesetzt, jedoch wurde für jede PCR die optimale Konzentration der dNTPs (0,2-0,4 mM), MgCl₂ (0,8-2 mM), Oligonukleotide (0,2-0,4 µM) sowie Primer-spezifische-Annealingtemperaturen zwischen 42-72 °C bestimmt.

Das PCR-Programm im Thermocycler (Biometra GmbH) lautete, wenn keine abweichenden Herstellerangaben für das verwendete Enzym vorlagen, wie folgt:

einleitende Denaturierung	95 °C, 2 min	
Denaturierung	95 °C, 30 s	} Zyklus 3-40x
Annealingtemperatur (Primerspez.)	42-72 °C, 30 s	
Elongation	1 min/kb, 72 °C	
finale Elongation	72 °C, 10 min	
Pause	4 °C	

Kontrollreaktionen zur Identifizierung von durch DNA-Kontamination falsch entstandenen positiven Banden wurden mitgeführt, indem die Kontrollen aus der RT-Reaktion (Abschnitt 7.2.6.2) bzw. ddH₂O als Template bei der PCR eingesetzt wurden.

Zur Verifizierung des amplifizierten DNA-Produkts wurde dieses mittels Agarosegel-Elektrophorese entsprechend der Länge nach aufgetrennt.

7.2.6.6 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung amplifizierter PCR-Produkte zur Fragment-Sequenzierung erfolgte unter Anwendung des pGMT® Easy Vector Systems (Promega Corporation) oder dem CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific Inc.) nach Herstellerangaben.

Material und Methoden

7.2.6.7 *Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung*

Zur Verbesserung der Qualität der DNA-Sequenzierung wurden die dNTPs und Oligonukleotide aus den zu sequenzierenden Amplifikaten entfernt.

Zur Aufreinigung von 20 μl PCR-Produkt wurde dem Ansatz 8 μl des Exonuklease I / Fast-AP-Reaktionsansatzes hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C sowie anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Ein Exonuklease I / Fast-AP-Reaktionsansatz enthielt:

0,025 μl	Exonuclease I (20 U/ μl), (Thermo Scientific, USA)
0,250 μl	FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μl), (Thermo Scientific, USA)
9,725 μl	ddH ₂ O
<hr/>	
10,0 μl	Σ

Abschließend wurde der Ansatz auf 30 μl mit ddH₂O aufgefüllt.

Im Gegensatz dazu wurden mittels der Elektrophorese aufgetrennte PCR-Amplifikate nach Herstellerangaben des Gel / PCR Fragments Extraction Kits (Avegene Life Science) aus der Agarose gelöst und aufgereinigt.

7.2.6.8 *Sequenzierungen*

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden mit Standard- oder genspezifischen Oligonukleotiden von der Firma Eurofins Scientific (Nantes, Frankreich) unter Standardbedingungen durchgeführt und mittels des Analyseprogramms SeqMan 5.05 (DNASTar Inc., Madison, USA) ausgewertet.

7.2.7 *Hairpin-Bisulfit PCR zur Analyse komplementärer DNA-Stränge*

Die *Hairpin*-Bisulfit PCR für gDNA basiert auf einer modifizierten Methode von Laird *et al.* (Laird *et al.*, 2004) und dient der Methylierungsanalyse komplementärer DNA-Stränge (Abbildung 5).

Unter Anwendung der Mikro-Präparationsmethode (Abschnitt 7.2.6.1) wurden mindestens 10 Endosperme (6 dap) bzw. 100 Embryonen (7 dap) der Maishybride isoliert und einer gDNA-

Material und Methoden

Extraktion (Abschnitt 7.2.6.4) unterzogen. Zur Minimierung des Verlusts von DNA wurde dem Fällungsansatz 1 μl (5 mg/ml) lineares Acrylamid (life technologies Corporation) beigefügt.

Anschließend wurde die gDNA mithilfe des nicht-methylierungssensitiven Enzyms FokI (1000 U) (New England BioLabs Inc.) 1 h bei 37 °C nach folgendem Ansatz restringiert:

3,0 μl	10x Puffer 4 (New England BioLabs Inc.)
1,0 μl	Restriktionsenzym FokI (1000 U), (New England BioLabs Inc.)
26,0 μl	gDNA
<hr/>	
30,0 μl	Σ

Danach wurde der *Hairpin-Linker* mittels DNA-Ligase an die FokI-Schnittstellen ligiert, wodurch eine kovalente Bindung der komplementären Stränge über die *Hairpin*-Struktur zustande kommt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 μl	FokI <i>Hairpin-Linker</i> (10 pmol/ μl), (Metabion GmbH), (Tabelle 9)
5,0 μl	PEG 4000 (Thermo Scientific Inc.)
5,0 μl	ATP (5 mM), (Thermo Scientific Inc.)
5,0 μl	T4 DNA Ligase (1 U/ μl), (Thermo Scientific Inc.)
4,0 μl	ddH ₂ O
<hr/>	
20,0 μl	Σ

Die restringierte gDNA wurde mit dem *Hairpin-Linker* Ligationsmix versetzt, mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert und mit Ethanol gefällt. Dem Fällungsansatz wurde zusätzlich 1 μl (5 mg/ml) lineares Acrylamid (life technologies Corporation) hinzugefügt. Die pelletierte gDNA wurde in 40 μl 0,3 M NaOH aufgenommen (Miner *et al.*, 2004). Folgend wurde die Methode der Bisulfitkonvertierung zur Analyse der DNA-Methylierung herangezogen. Jedoch ist eine normale Denaturierung aufgrund der schnellen Renaturierung des *Hairpin-Linkers* unzureichend (Laird *et al.*, 2004). Infolgedessen wurde eine Methode durchgeführt, die auf zwei Protokollen basiert (EpiTect® Plus Bisulfite- (Qiagen N.V.), Laird *et al.* (Laird *et al.*, 2004). Zur Lösung dieses Problems wurde die in NaOH aufgenommene gDNA entsprechend den EpiTect® Plus Bisulfite-Kit Herstellerangaben konvertiert, jedoch wurde die *Hairpin*-DNA nach einem modifizierten Thermocyclerprogramm (1x 20 min 42 °C; 6x 2 min 99 °C, 60 min 55 °C; ∞ 20 °C) mehrfach

Material und Methoden

alkalisch, thermisch denaturiert und inkubiert (Laird *et al.*, 2004). Anschließend wurde die Bisulfit-konvertierte *Hairpin*-DNA unter Anwendung der PCR (Abschnitt 7.2.6.5) mit strangspezifischen Methylierungs-Oligonukleotiden (Laird *et al.*, 2004) amplifiziert. Die Methylierungs-Oligonukleotide bestehen aus einem Gemisch unterschiedlicher Versionen eines strangspezifischen Oligonukleotids mit variablen Nukleotiden an den potenziell methylierten Stellen der Zielsequenz. Dieses ermöglicht eine komplementäre Anlagerung sowohl an das nicht konvertierte Cytosin als auch an das konvertierte Uracil der Bisulfit-behandelten gDNA. Mithilfe des ersten Methylierungs-Oligonukleotids, welcher die variablen Nukleotide A oder G aufweist, wird eine doppelsträngige DNA beider komplementären Stränge synthetisiert. Anschließend amplifiziert ein zweites, zum synthetisierten Strang, komplementäres Methylierungs-Oligonukleotid die Sequenz mittels PCR. Das zweite Oligonukleotid verfügt entsprechend über die variablen Nukleotide C oder T in der Zielsequenz. Als Ausgangstemplate für die PCR dienten 2 µl Endosperm bzw. 5 µl Embryo konvertierte *Hairpin*-gDNA. Das resultierende PCR-Amplifikat wurde zur Eliminierung unspezifischer Produkte aus dem Agarosegel isoliert, kloniert (Abschnitt 7.2.6.6) und mittels der PCR (Abschnitt 7.2.6.5) positiv gescreente Klone anschließend zur Methylierungsanalyse sequenziert (Abschnitt 7.2.6.8).

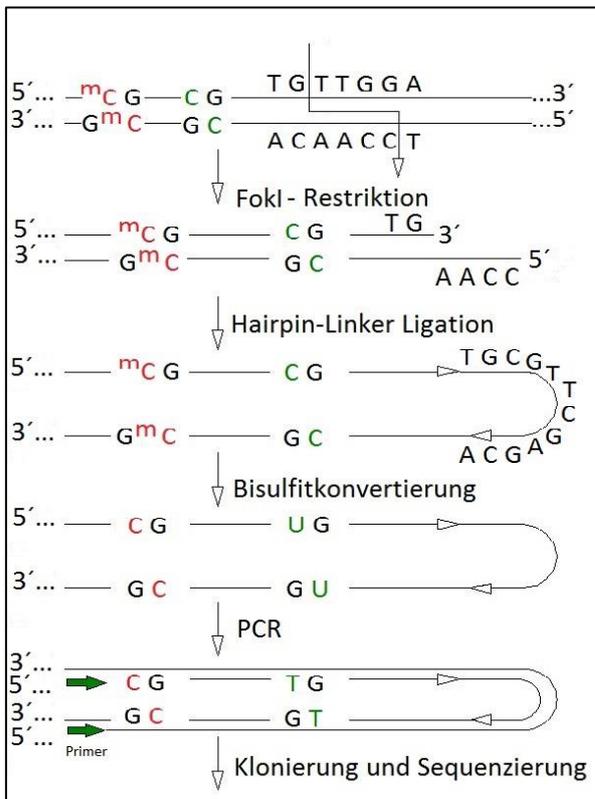


Abbildung 5: Versuchsdurchführung der *Hairpin*-Bisulfit PCR.

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der *Hairpin*-Bisulfit PCR Versuchsdurchführung zur Analyse komplementärer DNA-Stränge. Die komplementären Stränge der zu untersuchenden Sequenz wurden restringiert und

Material und Methoden

mithilfe eines *Hairpin-Linkers* verbunden. Methyliertes Cytosin (rotes C) wird durch Behandlung mit Bisulfit nicht konvertiert, wohingegen nicht methyliertes Cytosin (grünes C) zu Uracil konvertiert wird. Die konvertierte gDNA wird mittels PCR mit strangspezifischen Methylierungs-Oligonukleotiden amplifiziert, kloniert und sequenziert.

7.2.8 Identifikation neuer imprinteter Gene in Mais

7.2.8.1 Allelspezifische Expressionsanalysen reziproker Maislinien

Für allelspezifische Expressionsanalysen wurden Maisnuzchtlinien bzw. transgene Pflanzen reziprok gekreuzt und das Endosperm bzw. Embryo (6 dap) mittels Mikro-Präparation (Abschnitt 7.2.6.1) isoliert. Im Anschluss wurde die mRNA mittels Dynabeads® aus dem Gewebe isoliert und SMART-cDNA (Abschnitt 7.2.6.3) amplifiziert. Die cDNA diente als Template für genspezifische PCRs (Abschnitt 7.2.6.5) deren amplifiziertes PCR-Produkt zur Analyse sequenziert wurde (Abschnitt 7.2.6.8). Schließlich wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) innerhalb der transkribierten Sequenz zwischen den reziproken Kreuzungen gesucht. Im Falle eines identifizierten SNPs in den Sequenzen zwischen reziprok gekreuzten Linien weisen die Chromatogramme unterschiedliche Nukleotid-Signalintensitäten auf.

Zur Ermittlung einer imprinteten Genexpression wurde das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Basen des Polymorphismus herangezogen. Mit Berücksichtigung des 2:1 (maternal:paternal) Transkriptverhältnisses im Endosperm, wurde in dieser Arbeit eine Expression als imprintet bezeichnet, wenn das Chromatogramm einen 3-fach höheren Schwellenwert zwischen den unterschiedlichen Polymorphismenbasen für ein elterliches Allel in beiden reziproken Hybriden aufgewiesen hat. Zur Überprüfung, welches elterliche Allel in den als imprintet identifizierten SNPs der reziproken Kreuzungen exprimiert ist, wurde der zu untersuchende Sequenzabschnitt aus Inzuchtlinien cDNA bzw. gDNA, entsprechend der reziproken Kreuzung, amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt sequenziert und die ermittelte Sequenz zur Bestimmung einer maternalen oder paternalen Expression des Gens zusammen mit den Sequenzen der reziproken Kreuzungen analysiert.

7.2.8.2 Identifizierung syntenisch, imprinteter Gene zwischen Reis und Mais

Zur Identifizierung neuer imprinteter Gene in Mais wurden bekannte imprintete Gene von Luo *et al.* (Luo *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011) aus Reis-Endosperm (5 dap) ausgewählt und deren entsprechenden syntenischen Gene in Mais identifiziert. Die Gene wurden mittels des webbasierten Synteny Mapping and Analysis Program (SyMAP, Version3.4) (Soderlund *et al.*, 2011) unter Standardeinstellungen ermittelt.

Material und Methoden

Die Sequenzen der identifizierten syntenischen Gene in Mais wurden aus der MaizeSequence 5b.60-Datenbank (www.maizesequence.org) erhalten und genspezifische Oligonukleotide (Abschnitt 7.1.2) ausgewählt. Diese wurden für allelspezifische Expressionsanalysen (Abschnitt 7.2.8.1) mit fünf unterschiedlichen Genotypkombinationen (005 x 301, A188 x Mo17, B73 x H99, B73 x Mo17, Tex303 x W22), reziproker Hybride verwendet.

Zur weiteren Analyse der in Mais identifizierten imprinteten Gene wurden unter Verwendung der PCR (Abschnitt 7.2.6.5) Expressionsanalysen in Gameten und verschiedenen Maisgeweben durchgeführt.

7.2.8.3 Identifikation putativ imprinteter Gene im Maisembryo

Zum Nachweis putativ imprinteter Gene in Mais wurden 6 dap B73 x Mo17 reziprok gekreuzte Maisembryonen und Endosperm unter Anwendung der Mikro-Präparationsmethode isoliert (Abschnitt 7.2.5) und folgend SMART-cDNA amplifiziert (Abschnitt 7.2.6.3). Die cDNA wurde zur Ermittlung der Genexpression mittels des Illumina Genome Analyzer (LGC Genomics GmbH) tiefensequenziert.

Die Untersuchungen dieser Arbeit begrenzten sich auf die Analysen von 6 dap Maisembryonen. Dazu wurden die Fragmente (Reads) der Illumina-Sequenzierung auf dem Mais B73 Referenzgenom (Assemblierungsversion: B73 RefGen v2) lokalisiert und im Anschluss die Expressionslevel der Alignments mithilfe der TopHat-Cufflinks Computerprogrammabfolge (Trapnell *et al.*, 2012) ermittelt.

Des Weiteren wurden zur Bestimmung der allelspezifischen Genexpression die Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) zwischen den Inzuchtlinien B73 und Mo17 mittels der Fragmente entsprechend Waters *et al.* (Waters *et al.*, 2011) ermittelt. Anhand dieser SNPs konnten nun einzelne Reads der maternalen bzw. paternalen Expression zugeordnet werden und die Genexpressionshöhe mittels der Anzahl der Reads abgeleitet werden. Anschließend wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt und Gene mit einer signifikanten ($\chi^2 < 0,01$) Abweichung vom 1:1 (maternal:paternal) Transkriptverhältnis und einer mindestens 90%igen maternalen bzw. paternalen Herkunft in beiden Hybriden für weitere Analysen des Imprintings ausgewählt.

Zur Überprüfung der putativ imprinteten Gene im Maisembryo wurden entsprechend der SNP-Positionen, die unter Anwendung des Integrative Genomics Viewer (IGV, www.broadinstitute.org/igv/) (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2013) ermittelt werden konnten, genspezifische Oligonukleotide (Abschnitt 7.1.2) ausgewählt. Unter Zuhilfenahme der

oben beschriebenen Methoden, wurden zur Identifizierung einer imprinteten Genexpression im Embryo allelspezifische Expressionsanalysen (Abschnitt 7.2.8.1) durchgeführt. Zur Überprüfung welches elterliche Allel in dem identifizierten SNP der reziproken Kreuzungen exprimiert wird, wurde das Gen aus Embryo cDNA der Inzuchtlinie B73 sowie gDNA aus Mo17 amplifiziert und sequenziert.

7.2.9 Untersuchungen zur Regulation des genomischen Imprintings

7.2.9.1 *MEE1* Expressionsanalysen

Zur funktionellen Analyse des maternal imprinteten Gens *MEE1* in planta wurde die Aktivität des endogenen *MEE1*-Promotors sowie die konstitutive Überexpression des Gens in transgenen Maispflanzen mithilfe eines GFP-Fusionsproteins untersucht.

Zur Erzeugung des *mee1*-GFP-Fusionskonstrukts unter der Kontrolle des endogenen *MEE1*-Promotors (*mee1*_{Pro}), wurde dieses zunächst in den pBlueSfi BA Vektor (DNA Cloning Service e.K.) zwischenkloniert und im Anschluss über zwei SfiI Schnittstellen in den binären Vektor P7Lox-int kloniert. Zur Steigerung der Expressionsrate enthält das Indikatorgen GFP ein ST-LS Intron aus der Kartoffel (Pang, 1996). Des Weiteren besitzt das Konstrukt (Abbildung 6) zur Selektion transgener Pflanzen eine Herbizidresistenz in Form des *bar* (bialaphos resistance) Gens, welches für eine Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) kodiert und eine Resistenz gegen das Herbizid Basta® (Bayer CropScience, Monheim am Rhein, Deutschland) bewirkt. Das *mee1*_{Pro}:*mee1*:GFP Konstrukt wurde über *Agrobacterium tumefaciens* in Mais transformiert (Abschnitt 7.2.4) und reziprok mit der Inzuchtlinie A188 oder H99 gekreuzt und 6 dap Maisendosperm isoliert. Aus dem Endospermgewebe (6 dap) wurde SMART-cDNA (Abschnitt 7.2.6.3) amplifiziert sowie gDNA (Abschnitt 7.2.6.4) isoliert, um schließlich die Integration und Expression des Gens *mee1* sowie des GFPs mithilfe der genspezifischen PCR (Abschnitt 7.2.6.5) zu detektieren. Außerdem wurden mittels *embryo rescue* (Abschnitt 7.2.2) transgene Nachkommen der Regenerate erzeugt, in Anschluss wurden diese Pflanzen geselbstet und das Endosperm (7 dap) mikroskopisch auf die Fluoreszenz des Indikatorgens GFP untersucht.

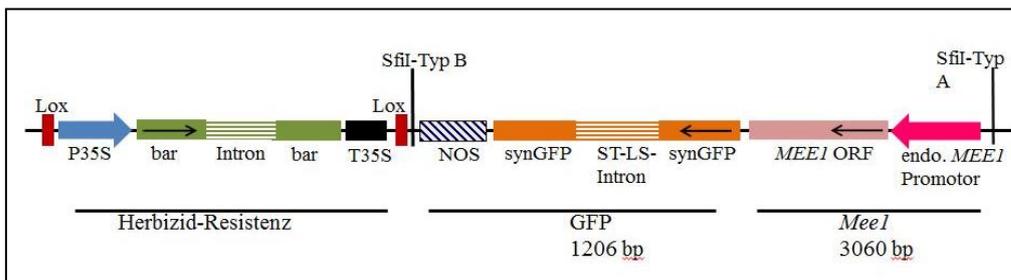


Abbildung 6: Schematische Darstellung des *mee1*_{Pro}:*mee1*:GFP Konstrukts.

Material und Methoden

Zur Erklärung siehe laufender Text. (Abkürzungen: P35S: 35S Promotor, bar: bialaphos resistance Gens, T35S: 35S Terminator, NOS: Nopalinsynthase-Transkriptionsterminator aus *Agrobacterium tumefaciens*, synGFP: synthetisches GFP Pang, 1996, ST-LS Intron: Intron aus der Kartoffel Pang, 1996, ORF: offener Leserahmen, endo.: endogen)

Zur Erzeugung transgener Maispflanzen mit einer konstitutiven Überexpression des maternal imprinteten Gens *mee1*, wurde das Gen *mee1* mithilfe des Restriktionsenzym BamHI in den pMon30049 Vektor (Pang, 1996) kloniert. Das daraus resultierende Fusionskonstrukt wird mittels des in Pflanzen konstitutiv exprimierten CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus reguliert und weist als Reporter gen GFP auf, welches zur Steigerung der Expressionsrate ein ST-LS Intron aus der Kartoffel enthält (Abbildung 7) (Pang, 1996). Ebenso zur Verstärkung der Expression, ist dem CaMV 35S-Promotor das Intron des 70 kD Hitzeschockproteins (hsp70) aus *Zea mays* nachgeschaltet. Zur Selektion des Plasmids besitzt das Konstrukt eine Kanamycin-Resistenz. Das 35S:hsp70:*mee1*:GFP Konstrukt wurde mithilfe des biolistischen Beschusses (Abschnitt 7.2.3) in Maisembryonen (10 dap) stabil transformiert. Die transgenen Pflanzen wurden geselbstet und schließlich mittels gDNA und cDNA aus Blattmaterial auf die Integration und Expression des Indikatorgens GFP untersucht. Daneben wurde junges Blatt- und Wurzelmaterial transgener Pflanzen mikroskopisch auf die Fluoreszenz des GFPs analysiert.

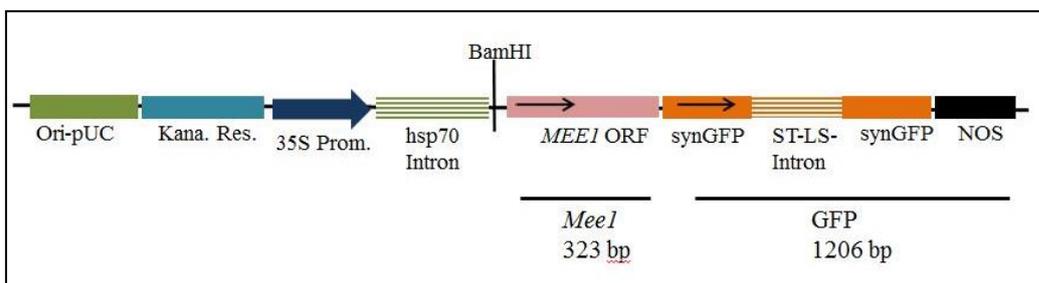


Abbildung 7: Schematische Darstellung des 35S:hsp70:*mee1*:GFP Konstrukts.

Die Abbildung zeigt den Aufbau des 35S:hsp70:*mee1*:GFP Konstrukts des pMon30049 Vektors (Pang, 1996). Zur Erklärung siehe laufender Text. (Abkürzungen: Ori-pUC: *origin of replication*, Kana. Res.: Kanamycin Resistenz, 35S Prom.: 35S Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, hsp70 Intron: Hitzeschockprotein 70 Intron, ORF: offener Leserahmen, synGFP: synthetisches GFP (Pang, 1996), ST-LS Intron: Intron aus der Kartoffel (Pang, 1996), NOS: Nopalinsynthase-Transkriptionsterminator aus *Agrobacterium tumefaciens*).

7.2.9.2 Funktionelle Analyse des Gens *MEE1* über homologe Gene in *Arabidopsis*

Zur Untersuchung, ob ein Funktionsverlust des Gens *MEE1* zu Entwicklungsstörungen im Samen führt, wurden homologe Gene in *Arabidopsis* zu *MEE1* aus Mais identifiziert und Doppelmutanten generiert.

Material und Methoden

Das European Arabidopsis Stock Centre stellte eine heterozygote Samenmischung bereit, und die Geotypisierung der Pflanzen mittels Multiplex-PCR erfolgte wie Abbildung 8 dargestellt. Die PCR wurde mit isolierter gDNA aus Blattmaterial und genspezifischen Oligonukleotiden sowie einem T-DNA spezifischen Oligonukleotid für SALK-Linien zur Genotypisierung von Wildtypen, heterozygoten und homozygoten Pflanzen durchgeführt (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Abbildung 8). Zur Generierung von Doppelmutanten wurden heterozygote Pflanzen der T-DNA-Insertionslinien des Gens AT3G11600 (SALK_048394, SALK_093234) mit denen des Gens AT5G06270 (SALK_089888 und SALK_042914) reziprok gekreuzt. Im Anschluss wurde die sich aufspaltende Population der verschiedenen reziproken Kreuzungen auf die Insertion im Chromosom drei und Chromosom fünf mittels Genotypisierung analysiert. Aufgrund der vermuteten embryonalen Letalität bei reinerbig homozygoten Doppelmutanten wurden Doppelmutanten mit einer homozygoten und einer heterozygoten Insertion für die Analysen ausgewählt. Die ausgewählten Doppelmutanten SALK_093234 (Homozygot) x SALK_042914 (Heterozygot) und SALK_093234 (Heterozygot) x SALK_042914 (Homozygot) wurden geselbstet und im Anschluss die Samen mikroskopisch auf die Entwicklung untersucht

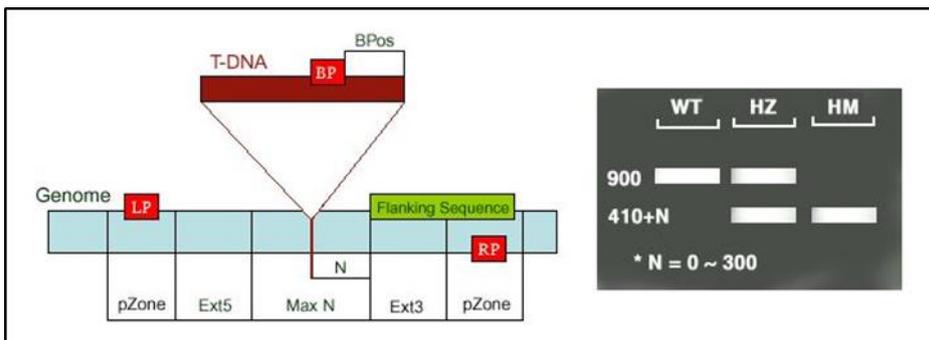


Abbildung 8: Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien in *Arabidopsis*

Schematische Darstellung der Multiplex-PCR zur Genotypisierung von *Arabidopsis* T-DNA-Linien. Die Oligonukleotide wurden entsprechend des SALK T-DNA Oligonukleotid Designs (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) für jede Insertionslinie ausgewählt. Die PCR wurde mit genspezifischen LP und RP Oligonukleotiden sowie einem T-DNA spezifischen BP (LBb1) Oligonukleotid durchgeführt. Die rechte Abbildung zeigt die amplifizierten PCR-Produkte nach der Agarosegelelektrophoretischen Auftrennung, der Nachweis von Wildtyppflanzen erfolgt mittels den Oligonukleotiden LP und RP, Homozygote mit BP (LBb1) und RP, wohingegen in heterozygoten Pflanzen beide Produkte amplifiziert werden. Die Abbildung wurde von Signal.SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) übernommen. Abkürzungen: N: Differenz der Insertionsstelle und der flankierenden Sequenz Position, in der Regel 0 bis 300 Basen, MaxN: maximale Differenz der Insertionsstelle und der Sequenz, pZone: Oligonukleotide Region, Ext5, Ext3: Region zwischen MaxN und pZone

7.2.9.3 Untersuchung zur Rolle der Glykosylase *DNG105* für Imprinting

Um eine mögliche Rolle des *DNG105* bei der Regulation des genomischen Imprintings zu untersuchen, wurden die Auswirkungen einer verminderten *DNG105*-Expression auf die allespezifische Expression imprinteter Gene untersucht. Die Suppression des *DNG105* in Mais wurde über RNA Interferenz (RNAi) vermittelt.

Zur Erzeugung RNAi-auslösender doppelsträngiger *Hairpin*-RNA (Smith *et al.*, 2000) wurde eine 300 bp große Teilsequenz des *DNG105*-Gens aus *Zea mays* ausgewählt und mittels PCR amplifiziert. Die PCR wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, welche an den 5' Enden über die Restriktionsschnittstellen BamHI/EcoRI bzw. SpeI/SalI verfügen. Nach der Restriktion des PCR-Produkts mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (BamHI/SpeI, EcoRI/SalI), ließen sich beide Amplifikate gerichtet in den pLNU-SG Vektor (DNA Cloning Service, Deutschland) klonieren. Anschließend flankierten beide Gensequenzen invers eine Spacer-GUS-Sequenz, die nach einer erfolgreichen Transkription eine *Hairpin*-Struktur ausbildet. Die Expression des RNAi-Konstrukts wird konstitutiv über einen Ubiquitin Promoter aus Mais reguliert (Abbildung 9).

Das Konstrukt wurde durch einen biolistischen Beschuss (Abschnitt 7.2.3) in Maisembryonen (10 dap) stabil transformiert. Transgene Maispflanzen wurden reziprok mit den Inzuchtlinien B73 und Mo17 gekreuzt, das Maisendosperm (6 dap) der *DNG105* RNAi Hybride unter Anwendung der Mikro-Präparation (Abschnitt 7.2.5) isoliert und SMART-cDNA (Abschnitt 7.2.6.3) amplifiziert. Danach wurde die Expression im Endosperm für jeweils zwei maternal und paternal imprintete Gene mittels allelspezifischer Expressionsanalysen (Abschnitt 7.2.8.1) untersucht. Die identifizierten SNPs der reziproken *dng105* RNAi-Kreuzungen wurden zur Kontrolle mit amplifizierten SNPs der reziprok gekreuzten Inzuchtlinien B73 x XH99 (6 dap) verglichen. Die Linie XH99 entspricht dem Hybrid der Inzuchtlinien H99 x A188, das den genetischen Hintergrund der transgenen Linien darstellt. Zur Kontrolle der mit Mo17 durchgeführten reziproken Kreuzung wurde Endosperm cDNA (6 dap) der reziprok gekreuzten Inzuchtlinien Mo17 x A188 analysiert. Der Genotyp A188 wurde für diese Kontrollkreuzung ausgewählt, da die entsprechende gekreuzte cDNA, bestehend aus dem XH99-Genotyp, nicht zur Verfügung stand.

Zum Nachweis der Expression von *DNG105* in Maiswildtyppflanzen wurden Expressionsprofile in Gameten und verschiedenen Geweben mittels RT-PCR (Abschnitt 7.2.6.2) durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression der untersuchten imprinteten Gene sowie die von *DNG105* und zweier weiterer Glykosylasen (*DNG101*, *DNG102*) im Endosperm (6 dap) der reziproken *DNG105* RNAi-Hybride über RT-PCR (Abschnitt 7.2.6.2) untersucht.

Material und Methoden

Zur Bestimmung der Expressionsunterschiede des Transkripts des *DNG105* im Endosperm, wurde wie von Lê et al. (Lê *et al.*, 2005) beschrieben die Zyklenzahl, bei der ein sichtbares PCR-Produkt amplifiziert wurde, ermittelt.

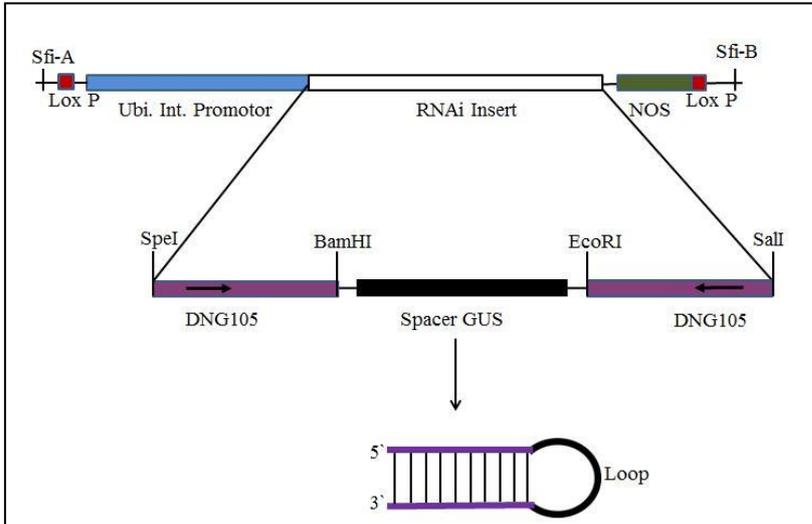


Abbildung 9: Schematische Darstellung des *dng105* RNAi-Konstrukts.

Zur Erklärung siehe laufender Text. (Abkürzungen: Ubi. Int.: Ubiquitin-Promotor mit Intron aus Mais, NOS: Nopalinsynthese-Transkriptionsterminator aus *Agrobacterium tumefaciens*, Spacer GUS: Fragment des β -Glukuronidase-Gens)

8 Ergebnisse

8.1 Identifikation neuer imprinteter Gene in Mais

8.1.1 Untersuchungen zur Konservierung der imprinteten Genregulation zwischen Reis und Mais über syntenisch imprintete Gene

Die Konservierung der Imprinting-Genregulation in Monokotyledonen wurde über die Identifikation und Expressionsanalyse syntenischer Gene zwischen Reis und Mais untersucht. Hierzu wurden unter Anwendung der Syntenie orthologe Maisgene zu imprinteten Genen aus Reis ermittelt. Zur Untersuchung der Imprinting-Regulation der Gene aus Mais wurden allelspezifische Expressionsanalysen durchgeführt. Außerdem erfolgte eine Charakterisierung der neuen imprinteten Gene in Mais über Expressionsprofile in verschiedenen Maisgeweben.

8.1.1.1 Identifikation orthologer Gene in Mais zu imprinteten Genen in Reis

Die Untersuchungen zur Konservierung der Imprinting-Genregulation basieren auf identifizierte imprintete Gene in Reisendosperm (5 dap) (Luo *et al.*, 2011). Luo *et al.* identifizierte unter Anwendung der RNA-Tiefensequenzierung 262 imprintete Loci im Reisendosperm und bestätigte über allelspezifische Expressionsanalysen für 49 Gene eine imprintete Expression (Luo *et al.*, 2011). Diese verifizierten imprinteten Gene in Reis wurden für die Analysen in dieser Arbeit ausgewählt. Zudem wurden sieben weitere Reisgene ausgesucht, die ausschließlich mithilfe der RNA-Tiefensequenzierung identifiziert wurden. Diese Gene weisen eine signifikante Homologie zu potenziell imprinteten Genen in *Arabidopsis* auf (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011). Mithilfe von SyMAP (Soderlund *et al.*, 2011) wurden für 32 von 56 Reisgenen syntenisch orthologe Gene in Mais ermittelt. Für neun Reisgene konnte ein orthologes Gen in Mais und für 22 Reisgene jeweils zwei Maisorthologe identifiziert werden. Des Weiteren wurde für ein imprintetes Gen in Reis drei orthologe Gene in Mais ermittelt. Insgesamt wurden somit 56 Maisgene mit einer syntenischen Verwandtschaft zu Reis für die allelspezifischen Expressionsanalysen ausgewählt.

8.1.1.2 Ergebnisse der allspezifischen Expressionsanalysen zur Identifikation imprinteter Gene in Mais

Die Untersuchung der Genregulation von 56 ausgewählten Maisgenen mit einer syntenischen Verwandtschaft zu Reis imprinteten Genen erfolgte über allelspezifische Expressionsanalysen. Für die Analysen wurde 6 dap Maisendosperm von fünf verschiedenen Genotypkombinationen

Ergebnisse

reziproker Kreuzungen verwendet. Die Entwicklung des 6 dap Maisendosperms entspricht dem Entwicklungslevel des 5 dap Reisendosperms. Für die allelspezifischen Expressionsanalysen wurden bis zu drei genspezifische Oligonukleotid-Kombinationen pro Gen, auf Basis der B73 Genomsequenz ausgewählt. Insgesamt wurden von 52 verschiedenen Maistranskripten Fragmente mit einer Länge von 243-2246 bp amplifiziert und sequenziert (Syntenie-Tabelle auf der beiliegenden CD). Die Validierung der Methode imprintete Gene mittels allelischer Expressionsmuster zu identifizieren erfolgte über die Untersuchung von drei bekannten imprinteten und zwei nicht-imprinteten Genen. Die Analyse der Polymorphismen bestätigt die maternale Expression der drei bekannten imprinteten Maisgene *FIE1*, *MEE1* und *MEG1* (Abbildung 35). Die Chromatogramme der ersten negativen Kontrolle (GRMZM2G150631) zeigen Doppelpeaks der verschiedenen Nukleotid-Signalintensitäten und entsprechen somit nicht dem Auswahlkriterium für Imprinting im Endosperm. In der zweiten negativen Kontrolle GRMZM5G816791 wurden ebenso Doppelpeaks amplifiziert, aber das identische Allel weist in beiden Kreuzungsrichtungen eine stärkere Signalintensität auf (Abbildung 36). Für 20 Transkripte der ausgewählten Maisgene wurde kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert. Die Sequenzanalysen ergaben, dass für 14 Gene kein Polymorphismus innerhalb der transkribierten Sequenz zwischen den reziproken Kreuzungen identifiziert wurde. Insgesamt konnten für 18 imprintete Reisgene 22 syntenische Orthologe in Mais unter Zuhilfenahme identifizierter SNPs untersucht werden (Tabelle 12). Für die Maisgene wurden maximal fünf Polymorphismen in den Sequenzen der reziproken Kreuzungen identifiziert. Die Position der untersuchten SNPs auf den Gentranskripten ist in der Syntenie-Tabelle (auf der beiliegenden CD) aufgeführt. Mittels der allelischen Expressionsmuster wurden im Maisendosperm vier maternal exprimierende Gene (MEGs) und sechs paternal exprimierende Gene (PEGs) identifiziert (Abbildung 12,13) (Tabelle 12). Des Weiteren wurden 12 Gene mit einer biallelischen Expression amplifiziert (Abbildung 37, 38, 39). 15 Gene konnten in einer Genotypkombination auf das amplifizierte allelische Expressionsmuster untersucht werden. Die Analysen zeigten, dass für vier nicht-imprintete Gene (NIG) die biallelische Expression in einer weiteren und für das NIG GRMZM2G418515 in zwei anderen Genotypkombinationen bestätigt werden konnte. Für das MEG GRMZM2G145300 und das PEG GRMZM5G897988 wurde in einer weiteren Genotypkombination eine biallelische Expression ermittelt. In den allelspezifischen Expressionsanalysen wurden vier paraloge Genpaare in Mais untersucht. In einem Genpaar lagen beide Gene als imprintet und in einem anderen Paar die paralogen Gene als NIG vor. Des Weiteren konnte für zwei Genpaare eine imprintete und eine nicht-imprintete Expression in den paralogen Genen amplifiziert werden (Tabelle 12).

Nach der Identifizierung der imprinteten Gene in Mais wurden für eine weitere Verifizierung der Methode allelische Expressionsmuster der imprinteten Maisgene mit einem übereinstimmenden

Ergebnisse

Mengenverhältnis von genomischer DNA zwei verschiedener Genotypen analysiert. Mittels allelspezifischer Expressionsanalysen wurde für zwei Gene ausschließlich ein Nukleotid an den untersuchten SNPs der imprinteten Gene amplifiziert. Für drei Gene konnte die Analyse aufgrund schlechter Sequenzqualität nicht durchgeführt werden. Eine identische bzw. fast identische Signalintensität der verschiedenen Nukleotide am SNP konnte für fünf der zehn imprinteten Maisgene detektiert werden (Abbildung 40)

8.1.1.3 Vergleichsanalysen der identifizierten Gene zu RNA- Tiefensequenzierungen aus späteren Entwicklungsstadien des Endosperms von Mais

Die von Waters *et al.* und Zhang *et al.* veröffentlichten Daten zu Maisendosperm exprimierten imprinteten Genen, wurden mittels RNA-Tiefensequenzierung erzeugt und verwendeten das Endosperm der Genotypen B73 und Mo17 nach 10 dap (Zhang *et al.*, 2011) und 14 dap (Waters *et al.*, 2011).

Ein Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Gene mit den Daten aus 10 dap Maisendosperm ergab, dass die identifizierten paternalen Gene GRMZM2G091819, GRMZM2G472052 ebenso eine imprintete Expression in 10 dap Endosperm aufweisen (Zhang *et al.*, 2011) (Tabelle 12). Waters *et al.* konnte in 14 dap Maisendosperm für 8 von 10 imprinteten Genen SNPs zwischen den Genotypen B73 und Mo17 detektieren (Waters *et al.*, 2011). Mittels der Daten aus 14 dap Endosperm (Waters *et al.*, 2011) konnte kein imprintetes Gen dieser Arbeit bestätigt werden. Allerdings weisen die zwei paternal imprinteten Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 aus 6 dap in den RNA-Tiefensequenzierungen eine signifikante paternale Expression auf (Waters *et al.*, 2011). Laut Waters *et al.* (Waters *et al.*, 2011) entsprechen die zwei Gene nicht den Selektionskriterien für eine Imprinting-Regulation, da nicht mindestens 90% der Sequenzfragmente mit einer paternalen Herkunft in beiden Hybriden detektiert wurden. Mithilfe der RNA-Tiefensequenzierung konnte Waters *et al.* (Waters *et al.*, 2011) für kein Gen, das in dieser Arbeit als NIG identifiziert wurde, eine Imprinting-Regulation nachweisen. Für das in 6 dap identifizierte imprintete Gen GRMZM5G871520 konnte in 14 dap Maisendosperm eine schwache Expression über ausschließlich paternale Reads detektiert werden. Die restlichen in 6 dap Endosperm ermittelten imprinteten Gene weisen in 14 dap Endosperm eine nicht-imprintete Expression auf (Waters *et al.*, 2011) (Tabelle 12).

Zur Untersuchung des Spezies-spezifischen Imprintings in Mais wurden die identifizierten NIGs sowie deren Paraloge auf eine Imprinting-Regulation analysiert. Die Daten der RNA-Tiefensequenzierungen von Zhang *et al.* und Waters *et al.* wurden hierzu auf Imprinting der ermittelten paralogen Maisgene untersucht (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Für zwei der

Ergebnisse

zwölf NIG in Mais wurde kein paraloges Gen identifiziert. In den Analysen konnten zwischen 1-51 Paraloge in Mais für die übrigen zehn NIG ermittelt werden. Für zehn der NIG konnten in ca. 50% der untersuchten Paralogen SNPs zwischen den Genotypen B73 und Mo17 ermittelt werden. (Waters *et al.*, 2011). Es wurde jedoch nur für ein Gen Imprinting nachgewiesen (Waters *et al.*, 2011), das deutet für die restlichen Gene auf ein Reis spezifisches Imprinting hin. Dagegen wurde das paraloge Gen AC191534.3_FG003 des NIGs GRMZM2G339151 als paternal imprintetes Gen im 10 dap und 14 dap Maisendosperm identifiziert (Tabelle 13) (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

8.1.1.4 Untersuchungen zur Konservierung imprinteter Gene zwischen Angiospermen

Um die Konservierung regulatorischer Mechanismen des Pflanzengenoms zwischen verschiedenen Spezies zu untersuchen, wurde der Imprintingstatus der homologen Gene aus Reis, Mais und *Arabidopsis* miteinander verglichen. Mithilfe der allelspezifischen Expressionsanalysen (Abschnitt 7.2.8.) konnte für 10 von 18 Reisgenen mindestens ein imprintetes syntenisch orthologes Gen in Mais identifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Konservierung zwischen den imprinteten Genen dieser beiden Gräser von 56% (Tabelle 12). Die hier vorliegenden Analysen in Mais schließen auch fünf Reisgene ein, für die imprintete orthologe Gene in *Arabidopsis* identifiziert wurden (Luo *et al.*, 2011). Es konnten für drei dieser fünf imprinteten Reisgene ein imprintetes orthologes Gen in Mais ermittelt werden (Tabelle 12). Für das Josephin Protein (Os01g63250.1) aus Reis wurden zwei paternal imprintete paraloge Gene (GRMZM5G897988, GRMZM2G148115) in Mais identifiziert. Der Vergleich der orthologen imprinteten Gene in Reis und Mais ergab, dass ein imprintetes Maisgen die Richtung der monoallelischen Expression wechselte. Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2011) wies für das Reisgen Os12g40520.1 eine paternale Expression nach. In Mais hingegen wurde eine maternal imprintete Expression für das Gen GRMZM2G145300 detektiert (Tabelle 12).

8.1.1.5 Expressionsprofile der identifizierten imprinteten Maisgene in Gameten und verschiedenen Geweben

Die Charakterisierung der neuen imprinteten Gene erfolgte über Expressionsprofile in Gameten sowie verschiedenen Maisgeweben mittels RT-PCR. Des Weiteren wurden die Gene zur Verifizierung und Vervollständigung der Expressionsprofile mithilfe des Maize Gene Expression Atlas (Sekhon *et al.*, 2011) untersucht.

Die Überprüfung, ob Transkripte der imprinteten Gene vor der Befruchtung vorliegen, wurde mit isolierten männlichen und weiblichen Gameten durchgeführt. Für zwei der vier MEGs

Ergebnisse

(GRMZM2G361398, GRMZM2G332495) konnten keine Transkripte in der Zentralzelle und für vier der sechs paternal exprimierten Gene (GRMZM5G897988, GRMZM2G148115, GRMZM2G5G871520, GRMZM2G091819) keine Transkripte in der Spermazelle nachgewiesen werden. Außerdem wurden für sechs von zehn imprinteten Genen Transkripte in den Gameten detektiert, die im Endosperm das stillgelegte Allel bereitstellen (Abbildung 10). Die Expression der neuen imprinteten Gene wurde ebenso in Embryo, Endosperm, Nucellus und weiteren somatischen Geweben untersucht. In den Analysen konnte für die Mehrheit der Gene eine Expression in Embryo, Anthere, Wurzel und Keimling detektiert werden. Mit Ausnahme des paternal exprimierten Gens GRMZM2G091819 wurden für alle imprinteten Gene Transkripte im Nucellusgewebe amplifiziert. Das maternal imprintete Gen GRMZM2G178435 zeigt eine bevorzugte Expression im Samen sowie eine sehr geringe Transkriptmenge in Anthere, Keimling und Wurzel. Für die Mehrheit der untersuchten MEGs und PEGs ließ sich eine Expression im Embryo und Endosperm zwischen 5 dap und 14 dap nachweisen. Das am stärksten spezifische Expressionsmuster, mit einer ausschließlich detektierten Expression im Endosperm, repräsentiert das paternal exprimierende Gen GRMZM2G091819 (Abbildung 10).

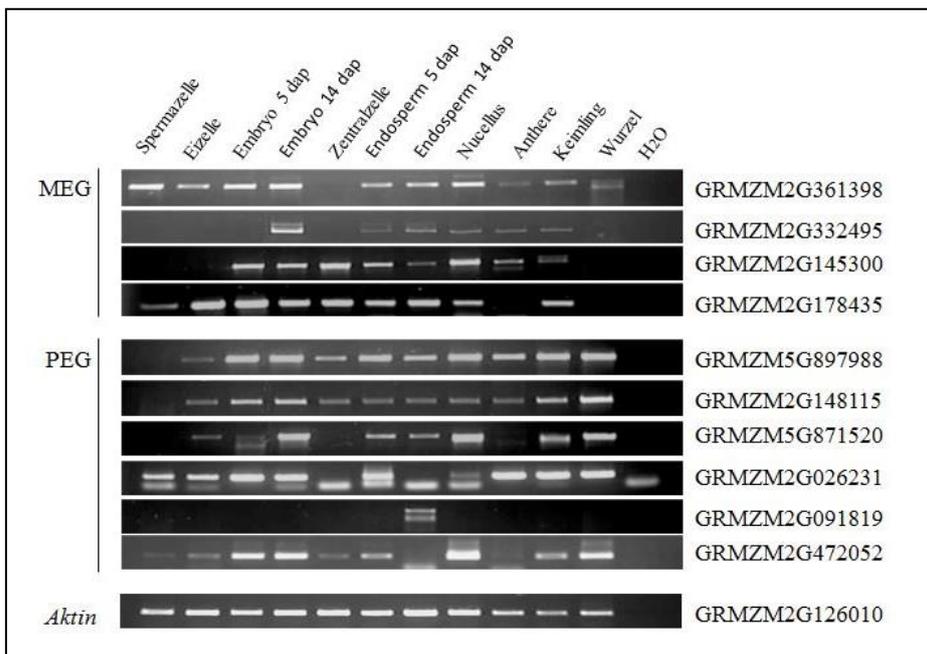


Abbildung 10: Gameten- und Gewebespezifische Expressionsprofile der identifizierten imprinteten Gene in Mais.

Mittels RT-PCR wurden Expressionsprofile der neuen imprinteten Gene in verschiedenen Maisgeweben sowie männlichen und weiblichen Gameten durchgeführt. Transkripte des Gens *Aktin* dienen als positive und Wasser als negative Kontrolle. Zum Nachweis, dass in den Analysen ausschließlich cDNA verwendet wurde, wurde in der *Aktin*-PCR gDNA eingesetzt. Die entsprechende Abbildung ist im Anhang zu finden (Abbildung 34).

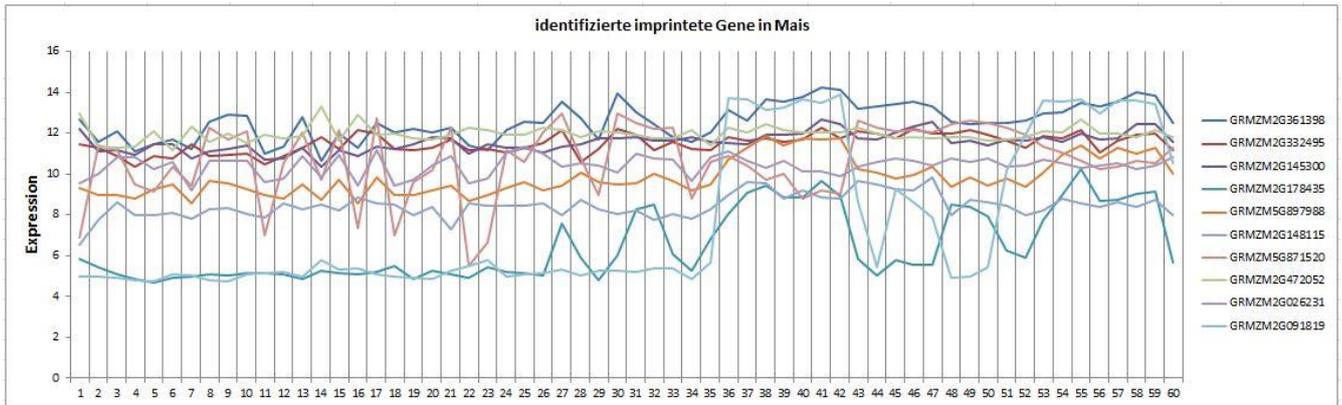
Ergebnisse

Die Überprüfung und Vervollständigung der amplifizierten Expressionsprofile der identifizierten imprinteten Gene erfolgte über den Maize Gene Expression Atlas (Sekhon *et al.*, 2011). Im Maize Gene Expression Atlas wurden alle in dieser Arbeit identifizierten imprinteten Gene in 60 Maisgeweben aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht (Sekhon *et al.*, 2011). Für eine Vergleichsanalyse wurde das Expressionsprofil der in dieser Arbeit identifizierten imprinteten Gene, sowie 10 MEGs bzw. PEGs aus 10 dap Endosperm (Zhang *et al.*, 2011) und 7 MEGs und 13 PEGs aus 14 dap Maisendosperm ermittelt (Waters *et al.*, 2011) (Abbildung 11). Alle in 14 dap Endosperm untersuchten Gene wurden über allelspezifische Expressionsanalysen und vier der MEGs (GRMZM2G370991, GRMZM2G160687, GRMZM2G062650, GRMZM2G354579) bzw. PEGs (GRMZM2G127160, GRMZM2G449489, GRMZM2G028366, GRMZM2G091819) aus 10 dap Maisendosperm mittels allelspezifischer Restriktionsenzyme verifiziert (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Die Expressionsdaten der Studie bestätigt die in dieser Arbeit amplifizierte Samen- und Endosperm-bevorzugte Expression der Gene GRMZM2G178435 (MEG) und GRMZM2G091819 (PEG). Mit Ausnahme der Gene GRMZM2G178435 (MEG) und GRMZM2G091819 (PEG) zeigen die anderen imprinteten Gene eine nahezu konstitutive Expression auf einem hohen Level in allen analysierten Geweben. Die Analyse ermittelte für das PEG GRMZM5G871520 ein differenzielles Expressionsmuster während der Blatt und reproduktiven Entwicklung. Der Expressionsvergleich der untersuchten imprinteten Gene in 6, 10 und 14 dap Maisendosperm ergab, dass für MEGs bzw. PEGs kein bevorzugtes Expressionsprofil detektiert werden konnte. Es wurden drei unterschiedliche Typen der Expressionsprofile ermittelt: Gene die eine universelle Expression auf einem hohen Level zeigen, Gene mit einer bevorzugten Expression im Endosperm (12-24 dap) und Samen (2-24 dap) sowie Gene die eine hohe differenzielle Expression in Wurzel, Blatt und der reproduktiven Entwicklung zeigen.

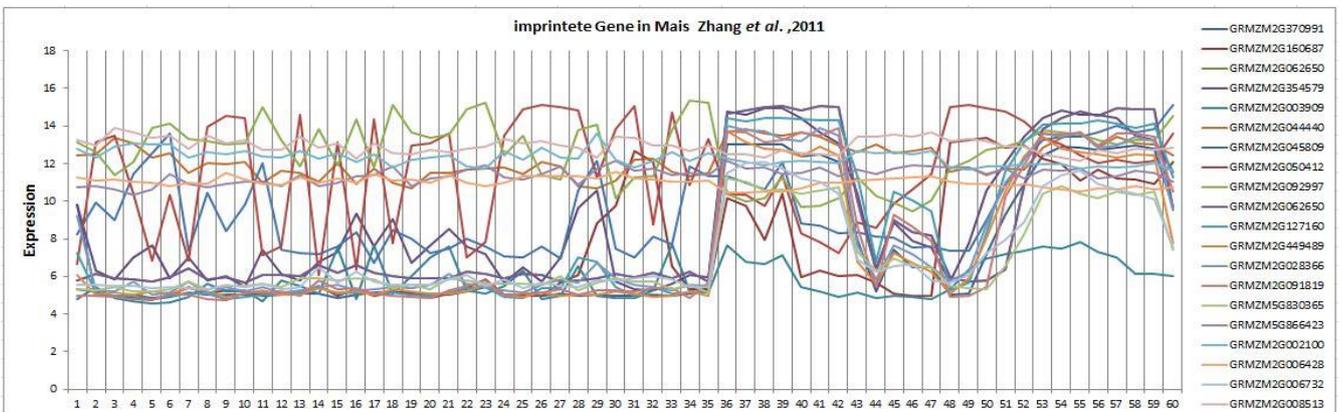
Ein Vergleich der Expressionsmuster der in dieser Arbeit identifizierten imprinteten Maisgene mit den entsprechenden Expressionsprofilen der orthologen Gene in Reis (Luo *et al.*, 2011), konnte in beiden Monokotylen für das Gen GRMZM2G091819 eine bevorzugte Expression im Endosperm nachweisen (Tabelle 12).

Ergebnisse

A)



B)



C)

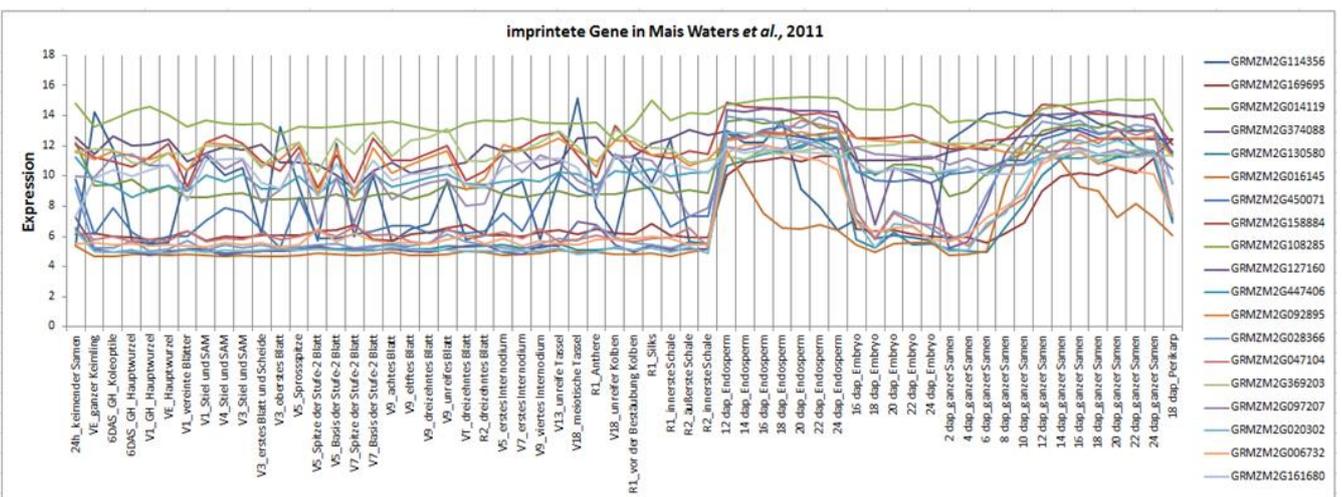


Abbildung 11: Mittels Sekhon *et al.*, 2011 erstellte Expressionsprofile imprinteter Gene in Mais

Die Diagramme zeigen die Expressionsprofile der in dieser Arbeit identifizierten imprinteten Gene (A) sowie ausgewählte imprintete Gene aus 10 dap (B) (Zhang *et al.*, 2011) und 14 dap (C) (Waters *et al.*, 2011) Maisendosperm. Die Expressionsdaten wurden in 60 Maisgeweben aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien ermittelt (Sekhon *et al.*, 2011).

Ergebnisse

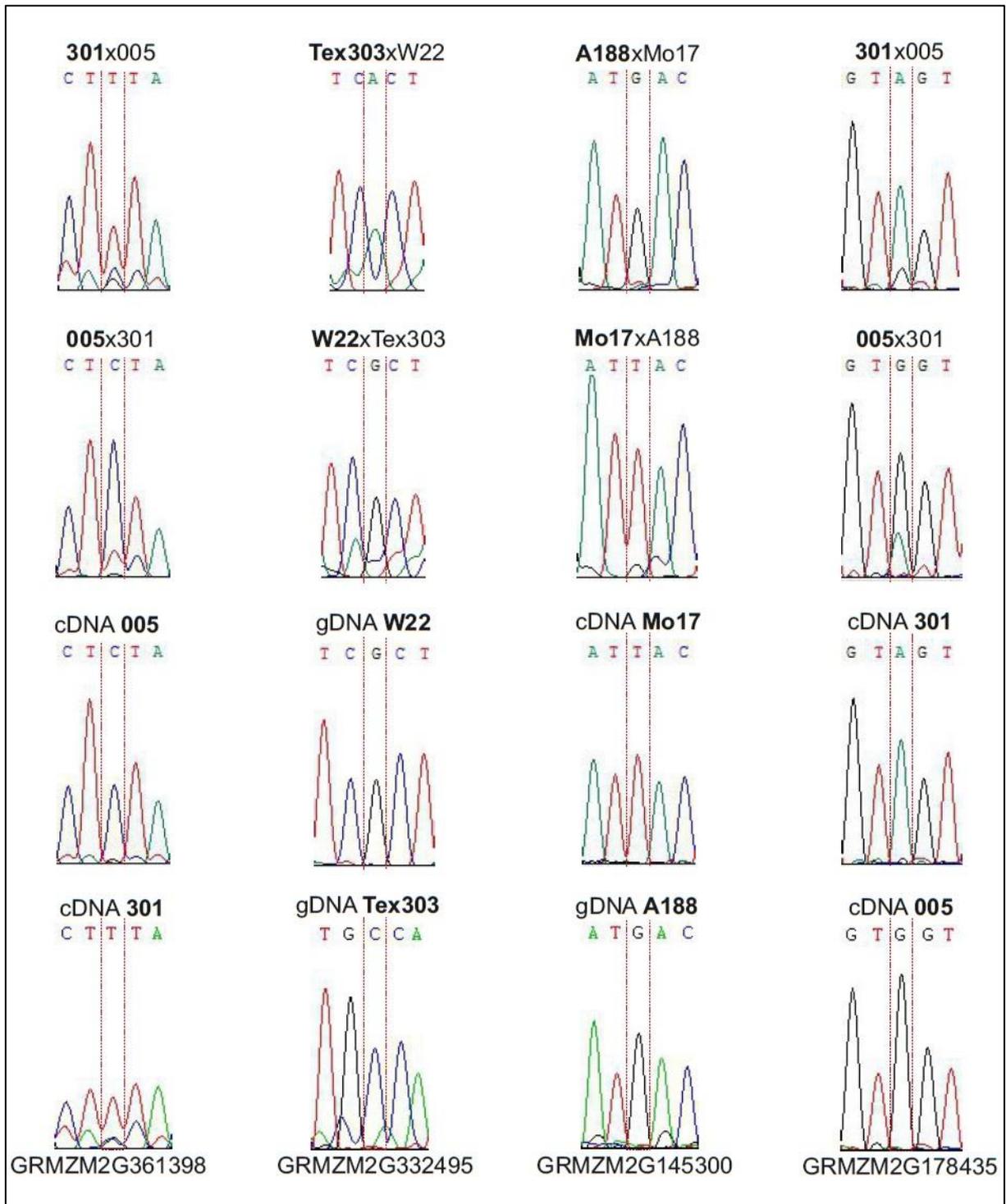


Abbildung 12: Chromatogramme der maternal imprinteten Gene im Maisendosperm.

Die Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen zeigen die analysierten SNPs für die maternal imprinteten Gene im Endosperm. Die Chromatogramme der reziproken Kreuzung und der Inzuchtlinien eines Gens sind jeweils untereinander angeordnet und der sich in der Mitte befindende SNP ist grafisch hervorgehoben. In der Beschriftung der Kreuzungsrichtung des jeweiligen Chromatogramms ist der Genotyp hervorgehoben, dessen Nucleotid am SNP detektiert wurde.

Ergebnisse

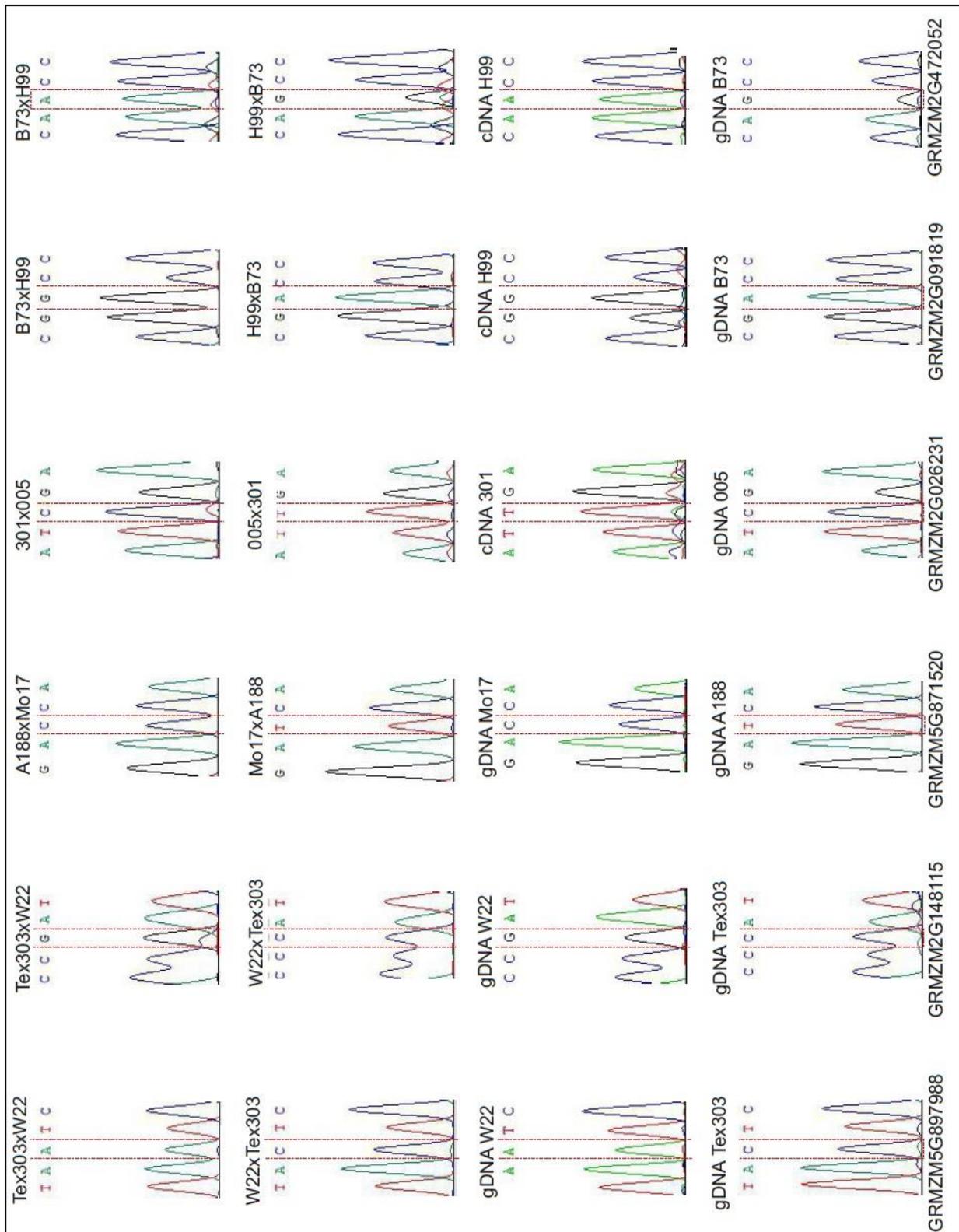


Abbildung 13: Chromatogramme der paternal imprinteten Gene im Maisendosperm.

Die Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen zeigen die analysierten SNPs für die paternal imprinteten Gene im Endosperm. Die Chromatogramme der reziproken Kreuzung und der Inzuchtlinien eines Gens sind jeweils untereinander angeordnet und der sich in der Mitte befindende SNP ist grafisch hervorgehoben. In der

Ergebnisse

Beschriftung der Kreuzungsrichtung des jeweiligen Chromatogramms ist der Genotyp hervorgehoben, dessen Nukleotid am SNP detektiert wurde.

8.1.2 Identifikation putativ imprinteter Gene im Maisembryo

Die Anzahl der bekannten imprinteten Gene im Maisembryo ist im Gegensatz zum Endosperm (Abschnitt 8.1.1) sehr gering (Köhler *et al.*, 2012). Aufgrund dessen wurden zur Identifikation putativ imprinteter Gene im Maisembryo, Gene mittels RNA-Tiefensequenzierung ausgewählt und die imprintete Expression im Anschluss mittels allelspezifischer Expressionsanalysen validiert.

8.1.2.1 Ergebnisse der RNA-Tiefensequenzierung im Maisembryo

Für die Analysen wurde cDNA aus Endosperm und Embryo der reziproken Kreuzung B73 x Mo17 (6 dap) über RNA-Tiefensequenzierungen untersucht. Die Analysen dieser Arbeit beschränkten sich auf Untersuchungen von 6 dap Maisembryonen. Anhand der ermittelten SNPs zwischen den Inzuchtlinien B73 und Mo17 konnten einzelne Sequenzfragmente (Reads) der maternalen bzw. paternalen Expression zugeordnet werden. Aus diesen Ergebnissen wurde die Höhe der Genexpression mittels der Anzahl der Fragmente abgeleitet. Anschließend wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt und sieben maternale Gene mit einer signifikanten ($\alpha < 0.02$) Abweichung vom 1:1 (maternal:paternal) Transkriptverhältnis und einer mindestens 85%igen maternalen bzw. paternalen Herkunft in beiden Hybriden erfasst. Sechs paternale Gene mit mindestens 10 Sequenzfragmenten, die eine Signifikanz von $\alpha < 0.05$ und eine mindestens 85%ige maternale bzw. paternale Herkunft aufwiesen wurden ausgewählt. Außerdem konnten jeweils vier maternale und vier paternale Gene bei einer höheren Signifikanz ($\alpha < 0.01$) sowie einer mindestens 90%igen monoparentalen Herkunft in beiden Hybriden bestätigt werden. Eine Zusammenfassung der ausgewählten putativ imprinteten Gene und eine Transkript- und Oligonukleotidanalyse ist in Tabelle 5 bzw. Tabelle 11 aufgeführt. Für die Gene GRMZM2G015767 und GRMZM2G083932 konnte in den Analysen der RNA-Tiefensequenzierung kein imprintetes Expressionsmuster im Endosperm nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Tabelle 5: Mittels der RNA-Tiefensequenzierung ausgewählte, putativ imprintete Gene des Maisembryos.

putatives Imprinting	Mais-Identifikationsnummer	Signifikanz (α / % parentale Reads in beiden Hybriden)
paternal	AC211403.4_Fg005	0,01 / 90
	GRMZM2G028366	0,01 / 90
	GRMZM2G093947	0,01 / 90
	GRMZM2G365731	0,01 / 90
	GRMZM2G015767	0,05 / 85
	GRMZM2G083932	0,05 / 85
maternal	GRMZM2G014119	0,01 / 90
	GRMZM2G014256	0,01 / 90
	GRMZM2G130580	0,01 / 90
	GRMZM2G370991	0,01 / 90
	GRMZM2G136364	0,02 / 85
	GRMZM2G354579	0,02 / 85
	GRMZM2G118205	0,02 / 85

8.1.2.2 Allelspezifische Expressionsanalysen der selektierten putativ imprinteten Gene des Maisembryos

Zur Verifizierung der putativ imprinteten Gene im Embryo wurden allelspezifische Expressionsanalysen durchgeführt. Zur Identifikation von SNPs zwischen den reziprok gekreuzten Inzuchtlinien B73 und Mo17 wurden bis zu drei genspezifische Oligonukleotidpaare für jedes Gen ausgewählt (Tabelle 11). Von den Maistranskripten wurden Fragmente mit einer Länge von 463-1689 bp amplifiziert (Tabelle 11) und sequenziert. Für zwei von vierzehn Genen konnten erfolgreich Polymorphismen innerhalb der transkribierten Sequenz zwischen den reziproken Kreuzungen identifiziert werden. Das Gen *FIE1* (GRMZM2G118205) konnte im Embryo nicht analysiert werden. Zur Ermittlung einer imprinteten Genexpression wurde das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Basen des Polymorphismus herangezogen. In den allelspezifischen Expressionsanalysen wurden 1 bzw. 11 SNPs für die Maisgene GRMZM2G093947 und GRMZM2G014256 in den Sequenzen der reziproken Kreuzungen identifiziert. Die Position der untersuchten SNPs auf den Gentranskripten ist in Abschnitt 12.3 aufgeführt. Die Chromatogramme von elf untersuchten SNPs zeigten einen Doppelpeak der verschiedenen Nukleotid-Signalintensitäten. Ein Vergleich der amplifizierten Sequenz des Gens

Ergebnisse

GRMZM2G014119 mit der Sequenz des paralogen Gens GRMZM2G044440 ergab, dass an den Positionen mit den amplifizierten Doppelpeaks die Gene unterschiedliche Nukleotide aufweisen. An den entsprechenden Positionen wurden die vorhergesagten Nukleotide von beiden Genen amplifiziert. Außerdem konnte für das Gen GRMZM2G014256 ein Polymorphismus mit monoallelischer Expression zwischen den reziproken Hybriden nachgewiesen werden. Das Gen GRMZM2G014256 konnte als maternal imprintet im Maisembryo verifiziert werden, durch den Vergleich der amplifizierten Sequenzen der Inzuchtlinien und der reziproken Kreuzungen (Abbildung 16).

Des Weiteren wurde für das Gen GRMZM2G014256 im Endosperm mittels RNA-Tiefensequenzierung eine signifikante (α 0,01) Abweichung vom 2:1 (maternal:paternal) Transkriptverhältnis und eine mindestens 90%ige maternale Herkunft in beiden Hybriden ermittelt. Aufgrund dessen wurde das Gen GRMZM2G014256 im Endosperm als putativ maternal imprintet identifiziert. Dieses wurde durch Amplifikation des Gens aus Endosperm (6 dap) cDNA der reziproken Maishybride B73 x Mo17 und der Inzuchtlinie B73 überprüft. Das allelische Expressionsmuster der Sequenzen aus dem Endosperm unterstützt die basierend auf der RNA-Tiefensequenzierung erwartete imprintete Expression im Endosperm nicht. In den Chromatogrammen einer Kreuzungsrichtung wurde eine biallelische Expression detektiert, die damit nicht den Auswahlkriterien für Imprinting im Endosperm entsprach (Abbildung 16).

Durch Begutachtung der detektierten Intron-Exon-Struktur der lokalisierten Fragmente mithilfe des Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2013) wurde festgestellt, dass keine Transkripte des als imprintet identifizierten Gens GRMZM2G014256 in der RNA-Tiefensequenzierung detektiert wurden (Abbildung 14). Allerdings wurde das auf dem Gegenstrang lokalisierte Gen GRMZM2G014119 im Embryo exprimiert und folglich analysiert. Beide Gene wurden auf Basis der Ähnlichkeit zu bekannten Protein- oder cDNA-Sequenzen von MaizeSequence 5b.60 und Ensembl (Version 71, www.ensembl.org) (Flicek *et al.*, 2011 // 2012) vorhergesagt.

Ergebnisse



Abbildung 14: Intron-Exon-Struktur der lokalisierten Fragmente

Darstellung der lokalisierten Fragmente für das Gen GRMZM2G014119 aus der RNA-Tiefensequenzierung mithilfe des Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2013). Im oberen Abschnitt sind die Daten aus dem Embryo und unten aus dem Endosperm gezeigt.

Mittels IGV und Gramene (#36b, <http://www.gramene.org/>) (Youens-Clark *et al.*, 2010 // 2011) konnte festgestellt werden, dass das Gen GRMZM2G014256 auf dem Vorwärts- (95841312-95843445) und GRMZM2G014119 auf dem Rückwärtsstrang (95841179-95843445) der übereinstimmenden Position auf Chromosom 6 lokalisiert sind (Abbildung 15a). Laut der Datenbank Gramene unterliegen die Gene keinem alternativen Splicing und GRMZM2G014256 transkribiert eine codierende Sequenz, wohingegen MaizeSequence 5b.60 die Gene als *Splice*-Varianten darstellt (Abbildung 15b) und für das Gen GRMZM2G014256 ein nicht-codierendes Transkript vorhersagt.

Ergebnisse

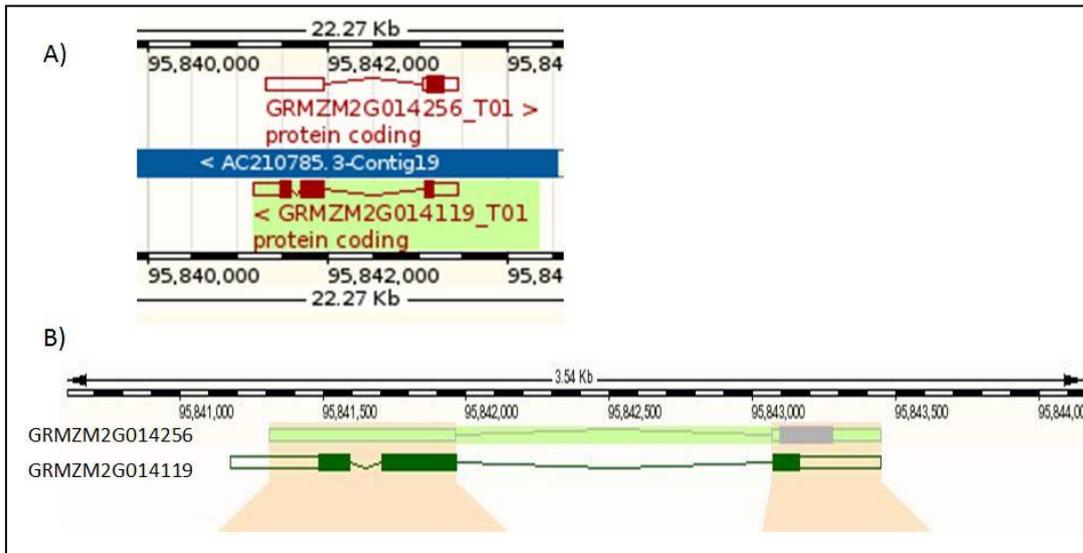


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Gene GRMZM2G014256 und GRMZM2G014119 auf dem Maisgenom.

A) Lokalisation der Gene GRMZM2G014256 und GRMZM2G014119 auf dem Chromosom 6, GRMZM2G014256 befindet sich auf dem Vorwärtsstrang und GRMZM2G014119 auf dem entsprechenden Rückwärtsstrang (Gramene #36b, www.gramene.org).

B) Die Abbildung wurde von MaizeSequence 5b.60 (www.maizesequenze.org) übernommen und zeigt die *Splice*-Varianten mittels der Exons (Balken) und Introns (verbindende Linien zwischen den Balken).

Die Analyse der Oligonukleotid-Bindungspositionen ergab, dass die ausgewählten Oligonukleotide für das Gen GRMZM2G014256 ebenfalls auf dem Transkript des Gens GRMZM2G014119 binden. Daraus geht hervor, dass beide Gene mit dem gleichen Oligonukleotidpaar amplifiziert werden können, in dieser Arbeit jedoch GRMZM2G014119 detektiert wurde, da für das Gen GRMZM2G014256 im Embryo keine Transkripte in der RNA-Tiefensequenzierung ermittelt wurden.

Ergebnisse

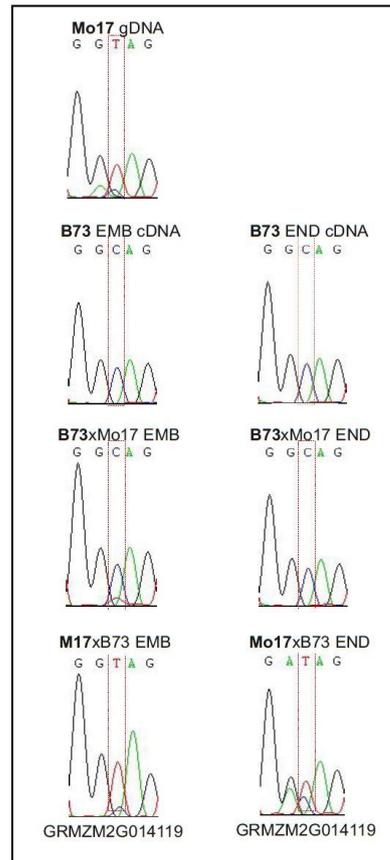


Abbildung 16: Sequenzausschnitte der allelspezifischen Expressionsanalyse der reziproken GRMZM2G014119 Kreuzung in Embryo und Endosperm.

Die Sequenzausschnitte zeigen den SNP des Gens GRMZM2G014119 der reziproken B73 x Mo17 Kreuzung in Embryo (6 dap) und Endosperm (6 dap). Beide Kreuzungsrichtungen und die Kontrollen des SNP in Embryo und Endosperm sind jeweils untereinander angeordnet, der sich in der Mitte befindende SNP ist grafisch hervorgehoben. In der Beschriftung des jeweiligen Sequenzausschnitts ist der Genotyp hervorgehoben, dessen Nukleotid am SNP detektiert wurde. Mittels des SNPs wurde für das Gen GRMZM2G014119 eine monoallelische Expression im Maisembryo ermittelt.

8.1.2.3 Analysen zum imprinteten Gen GRMZM2G014119

Das verifizierte maternal imprintete Gen GRMZM2G014119 besteht laut der Datenbank MaizeSequence 5b.60 aus einem 1051 bp langem Transkript. Für das aus 153 Aminosäuren aufgebaute Protein wird eine Pfam- (Ubiquitin-Familie, PF00240), SMART- (Ubiquitin, IPR000626) und Prints-Domäne (Ubiquitin Untergruppe, IPR019956) vorhergesagt.

Für dieses Gen ergaben die Tiefensequenzierungen eine 58-fach höhere Anzahl der maternalen Transkripte im Endosperm als im Embryo. Ein Vergleich zu detektierten Expressionslevel aus 14 und 25 dap Maisembryo unterstützt den Nachweis der schwächeren Expression des Gens im Embryo (Davidson *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011) (Abbildung 32). Außerdem wurde das Gen in einem Mais Expressionsatlas in 60 verschiedenen Geweben untersucht (Abbildung 17) (Sekhon *et*

Ergebnisse

al., 2011). Die Analysen ergaben eine ansteigende Expression im sich entwickelnden Korn sowie ein konstantes Transkriptniveau des Gens im 12-24 dap Endosperm und 16-24 dap Embryo.

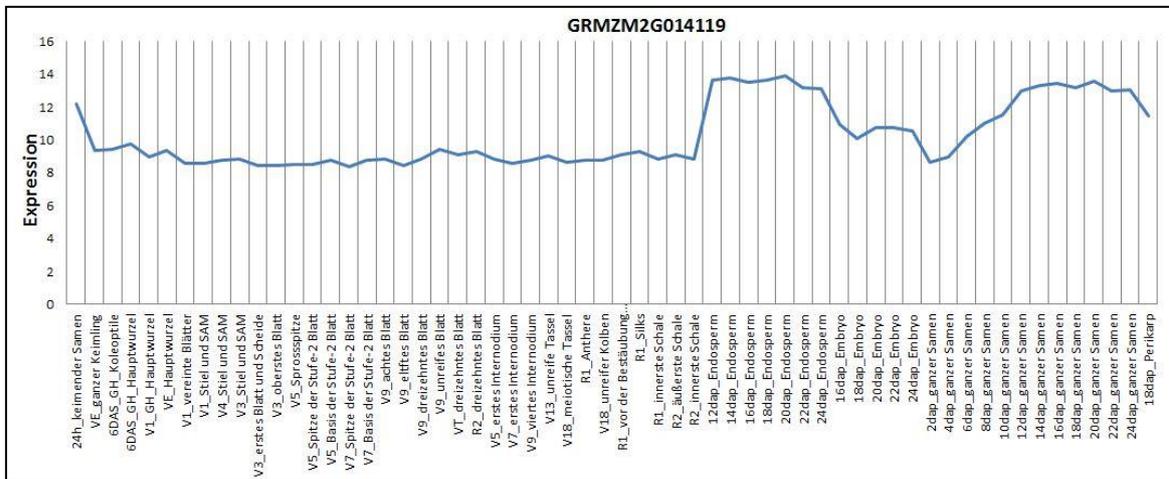


Abbildung 17: Expressionsprofil des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Geweben aus Mais.

Die Expression des Gens wurde in 60 verschiedenen Geweben der Maisentwicklung ermittelt und grafisch dargestellt. Die Expressionsdaten für das Gen GRMZM2G014119 wurden dem Maize Gene Expression Atlas (Sekhon *et al.*, 2011) entnommen.

Mittels MaizeSequence 5b.60 konnten für das maternal imprintete Gen GRMZM2G014119 im Maisembryo unter anderem in den Spezies Reis (LOC_Os06g44080), *Sorghum* (Sb10g025670), *Brachypodium* (Bradi1g30940) und *Arabidopsis* (AT1G31340.1) insgesamt 18 orthologe Gene ermittelt werden. Ebenfalls wurden vier paraloge Gene für das Gen GRMZM2G014119 vorausgesagt. Sequenzanalysen ergaben eine Übereinstimmung von 91% (GRMZM2G044440), 58% (GRMZM2G116689), 34% (GRMZM2G355959) und 16% (AC205295.3_FG002) der Gensequenz des identifizierten Gens GRMZM2G014119 mit den Gensequenzen der paralogen Gene der Maisgenomveröffentlichung 5b.60 auf MaizeSequence.

8.2 Untersuchung der Rolle der Glykosylase *DNG105* aus Mais für Imprinting

Um eine mögliche Rolle von DNA-Glykosylasen bei der Regulation des genomischen Imprintings zu untersuchen, wurden in einem Vorversuch Expressionsprofile der DNA-Glykosylasen (DNG) 101, 102 und 105 aus Mais erstellt. Dazu wurde die Expression der DNGs mittels RT-PCR in Gameten, Embryo (5 dap), primärem Endosperm, Endosperm (5 dap), Keimling und im Maiskolben untersucht (Abbildung 18). Die Analysen zeigten, dass *DNG105* im Gegensatz zu *DNG101* und *DNG102* in der Ei- und Zentralzelle sowie dem primären Endosperm nicht exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte in den Spermazellen eine Expression von *DNG105* nachgewiesen werden. Es konnte von *DNG101* und *DNG102* keine Expression in den Spermazellen detektiert

Ergebnisse

werden. Aufgrund dessen, dass für *DNG105* (Accession Number DV168989.1) keine Genredundanz vorliegt, wurde *DNG105* für weitere Analysen zur Regulation des Imprintings in Mais ausgewählt. Zur Funktionsanalyse wurden RNAi Maislinien generiert (Abschnitt 7.2.9.3) und mittels allelspezifischer Expressionsanalysen die Auswirkungen eines verminderten *DNG105* Transkripts auf die Regulation imprinteter Gene untersucht. Außerdem wurden zur Verifizierung einer genspezifischen Transkriptverminderung Expressionsprofile in Gameten und verschiedenen Geweben durchgeführt.

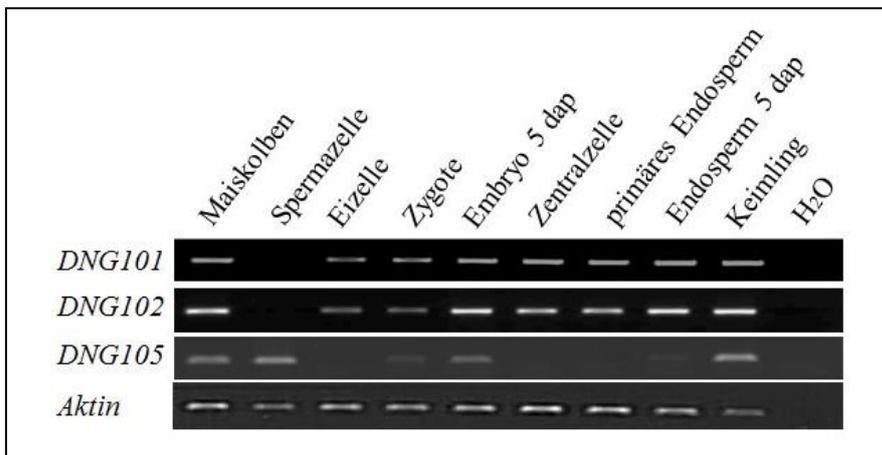


Abbildung 18: Expressionsprofile der *DNG101*, *DNG102* und *DNG105* aus Mais.

Die Analyse von RT-PCR Expressionsprofilen aus Gameten und somatischem Gewebe ergab, dass *DNG105* im Vergleich zu *DNG101* und *DNG102* in der Spermazelle, jedoch nicht in der Eizelle und der Zentralzelle transkribiert wird. Die Transkripte des Gens *Aktin* dienen als positive und Wasser als negative Kontrolle.

8.2.1 Charakterisierung der *DNG105* aus Mais

Mithilfe der Chromatin-Datenbank ChromDB (www.chromdb.org) (Gendler *et al.*, 2008) konnte für *DNG105* eine 14256 bp lange, auf Chromosom 5 lokalisierte, genomische Gensequenz ermittelt werden (Abbildung 19). Der Datenbank zufolge unterliegt das 3702 bp lange Transkript keinem alternativem Splicing und codiert für ein DEMETER-ähnliches (DML)-Protein der bifunktionalen DNA-Glykosylase Familie und wird demzufolge der ROS/DEMETER Proteingruppe zugeordnet. Das Protein ist aus 1233 Aminosäuren aufgebaut und besteht laut ChromDB aus einer Pfam-Domäne, die der HhH-GPD Superfamilie der Basenexzisionsreparatur-DNA-Proteine zugeordnet wird. Das kennzeichnende Merkmal der HhH-GPD Superfamilie (PF00730) ist eine Helix-Hairpin-Helix-Struktur und ein Glycin/Prolin-reicher Loop gefolgt von einer konservierten Asparaginsäure (Punta *et al.*, 2011). Die Pfam-Datenbank des HHMI Janelia farm research campus (Punta *et al.*, 2011) hingegen sagt für die Proteinsequenz von *DNG105* drei Pfam-Domänen voraus. Als

Ergebnisse

signifikante Domäne ermittelte die Pfam-Datenbank eine Domäne der RRM (*RNA recognition motif*) DME Familie an Position 1097-1199 (e-value $1,9e-47$).

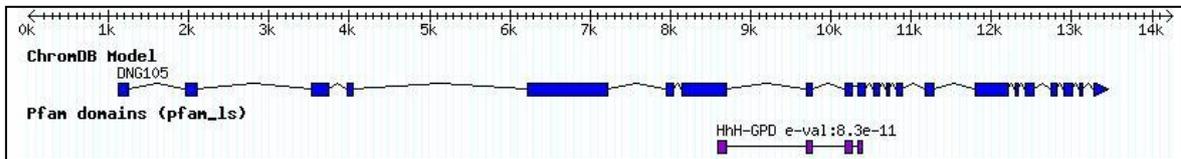


Abbildung 19: Transkript-Modell der *DNG105* aus Mais.

Die schematische Darstellung der Chromatin-Datenbank ChromDB (Gendler *et al.*, 2008) zeigt das 14256 bp große Transkript-Modell. Die blauen Balken entsprechen den Exons und die verbindenden Linien den Introns, es wurden keine weiteren alternativ gespleißten Transkripte ermittelt. Im unteren Bereich ist die Position der vorhergesagten Pfam-Domäne (HhH-GPD) dargestellt.

Zur weiteren Charakterisierung des *DNG105* wurde eine PCR-basierte semiquantitative Expressionsanalyse mit cDNA aus Gameten und unterschiedlichen Maisgeweben durchgeführt. Das charakteristische Expressionsmuster, welches in den Vorversuchen für *DNG105* nachgewiesen wurde (Abbildung 18), konnte in der Expressionsanalyse bestätigt werden. Es wurden erneut in der Spermazelle im Gegensatz zu Ei- und Zentralzelle Transkripte des Gens detektiert (Abbildung 20). Im 5 und 14 dap Endosperm wurde eine geringere Transkriptmenge als im 5 und 14 dap Embryo nachgewiesen. Zudem konnten *DNG105* Transkripte in der Zygote, dem Nucellus, der Anthere und dem somatischen Gewebe amplifiziert werden.

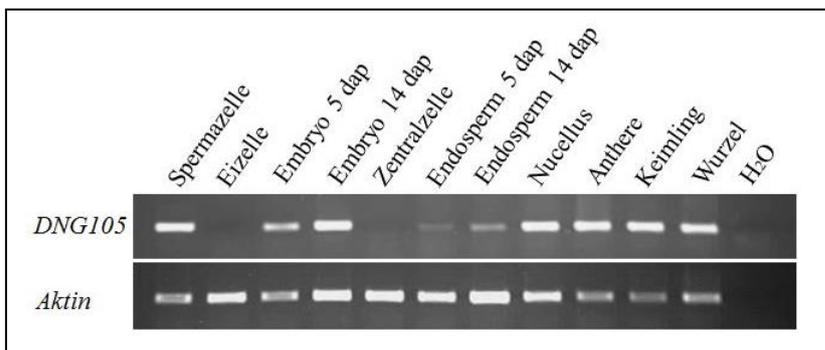


Abbildung 20: Expressionsprofil der Glykosylase 105 aus Mais.

Zur Bestätigung und Vervollständigung des Expressionsprofils aus den Vorversuchen (Abbildung 18) wurde mittels RT-PCR eine Expressionsanalyse des Gens *DNG105* in Gameten und verschiedenen Geweben durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde das Gen *Aktin* mitgeführt sowie Wasser als negative Kontrolle. Zum Nachweis, dass es sich bei den verwendeten Proben ausschließlich um cDNA handelte, wurde zusätzlich gDNA amplifiziert (Abbildung 34).

8.2.2 Überprüfung der Suppression von *DNG105* und Genspezifität der RNAi *dng105*-Sequenz

Zur Verifizierung einer *DNG105*-Transkriptverminderung des zur Untersuchung herangezogenen Endosperms, wurde eine PCR basierte semiquantitative Expressionsanalyse durchgeführt. Die

Ergebnisse

Analyse der Expressionsunterschiede zwischen den Kontrollen und den reziproken RNAi-Kreuzungen ergab eine Differenz von 3-6 Amplifikationszyklen, somit liegt laut Lê *et al.* (Lê *et al.*, 2005) eine 7-14-fache Differenz im Expressionslevel zwischen den reziproken Kontrollhybriden und den reziproken RNAi-Proben vor (Abbildung 21).

Die semiquantitative Expressionsanalyse zum Ausschluss unspezifischer Stilllegung homologer Sequenzen durch die *dng105* RNAi-Sequenz (Abbildung 21) zeigte für drei der vier reziproken Kontrollhybride unterschiedliche Transkriptmengen zwischen den reziproken B73 x XH99 bzw. A199 x Mo17 Kontrollen. Für die Proben XH99 x B73 bzw. A188 x Mo17 lag eine leicht erhöhte Transkriptmenge vor. Dieses differierende Transkriptniveau zwischen den beiden reziproken Endospermproben konnte ebenso in der reziproken *dng105* (265/7/1) x Mo17 Kreuzung nachgewiesen werden. Die Proben der reziproken *dng105* (265/7/1) x Mo17 Kreuzung zeigten im Vergleich zur reziproken Mo17 x A188 Kontrolle eine leicht verminderte Transkriptmenge in beiden Endospermproben. In den Analysen des Gens GRMZM2G472052 wurde für die reziproke Kontrollhybride A188 x Mo17 im Vergleich zur reziproken *dng105* (265/7/1) x Mo17 Kreuzung eine verminderte Transkriptmenge amplifiziert. Für das paternal imprintete Gen GRMZM2G091819 konnte nachgewiesen werden, dass die B73 x XH99 Kontrolle eine höhere Expression aufweist, als die zwei entsprechenden transgenen Kreuzungen. Im Gegensatz dazu wurde für die reziproke Kontrolle XH99 x B73 eine geringere Transkriptmenge detektiert, als für die transgenen Proben 267/14/1 x B73 und 270/5/3 x B73. Das Gen GRMZM2G091819 konnte mittels RT-PCR nicht in den Endospermproben der Genotypen A188 und Mo17 amplifiziert werden.

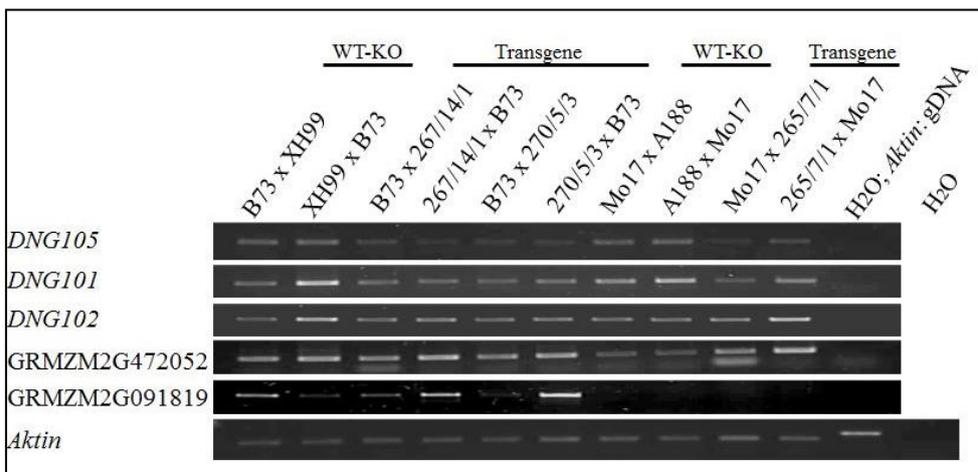


Abbildung 21: Expressionsanalysen reziproker *dng105*- und Kontrollkreuzungen in Endosperm.

Untersuchung einer möglichen Transkriptreduktion von *DNG105*, *DNG101*, *DNG102*, GRMZM2G472052 und GRMZM2G091819 im Endosperm der reziprok gekreuzten transgenen Maispflanzen mittels RT-PCR. Transkripte des Gens *Aktin* dienen als Positivkontrolle. Um gDNA-Kontaminationen ausschließen zu können, wurde in der *Aktin*-

Ergebnisse

Kontrolle zusätzlich gDNA analysiert. Aufgrund eines Introns kann für die gDNA ein größeres Fragment amplifiziert werden.

Zur Überprüfung der RNA-Spezifität der *dng105* RNAi-Sequenz wurde die 300 bp lange Sequenz mithilfe von BLAST ChromDB (<http://www.chromdb.org/blast.html>) mit der Nukleotidsequenzdatenbank verglichen. Übereinstimmende Sequenzabschnitte wurden unter anderem in *Sorghum bicolor* (*DNG2603*, Ros/Demeter Group, e-value $3e-36$) und *Setaria italica* (*DNG25804*, Ros/Demeter Group, e-value $6e-13$) festgestellt. Ein Vergleich der 300 bp großen RNAi-Sequenz gegen die Nukleotidsequenzdatenbank aus Mais zeigte jedoch, dass ebenfalls Homologien zu anderen Genen aus Mais wie *CHR124* (e-value 0.33) oder der RNA-Polymerase IV Untereinheit *NRPDA103* (e-value 0.33) vorliegen. Die Sequenzanalyse ergab, dass die übereinstimmenden Sequenzen in Mais eine maximale Länge von 16 bp aufweisen. Obwohl laut ChromDB keine Sequenzhomologie zwischen *DNG105* und *DNG101* bzw. *DNG102* vorliegt, konnten mittels eines Alignments der genomischen Sequenzen fünf homologe Abschnitte mit maximal 12 bp zwischen der *dng105* RNAi-Sequenz und *DNG101* festgestellt werden.

8.2.3 Analyse der *dng105* RNAi-Linie mittels allelspezifischer Expressionsanalysen imprinteter Gene im Maisendosperm

Zur funktionellen Analyse von *DNG105* wurde eine 300 bp lange Sequenz (Abschnitt 12.3) zur RNAi vermittelten Suppression des *DNG105*-Transkripts ausgewählt. Laut der Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB) (Monaco *et al.*, 2013) ist der ausgewählte RNAi-Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 an Position 162236986-162237285 bzw. an Position 8168-8468 der genomischen Sequenz von *DNG105* lokalisiert. Zur Herstellung transgener Maispflanzen wurde die Methode der biolistischen Transformation herangezogen und vier *dng105*-RNAi Maislinien mittels PCR als transgen bestätigt. Die Versuche wurden mit vier *dng105* RNAi-Linien (264, 265, 267, 270) durchgeführt, da Varianzen der Suppression des Gens in der Maispflanze vorliegen können.

Der Einfluss der RNAi-Stillegung des *DNG105* auf die Imprinting-Regulation, wurde anhand der maternal imprinteten Gene *FIE1* und *MEE1* sowie der in Abschnitt 8.1.2 identifizierten paternal imprinteten Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 mithilfe allelspezifischer Expressionsanalysen untersucht. In den allspezifischen Expressionsanalysen des maternal imprinteten Gens *MEE1* wurde kein Einfluss auf die imprintete Expression festgestellt. In den Kontrollhybriden (B73 x XH99, Mo17 x A188) sowie den reziprok gekreuzten RNAi-Linien (*dng105* x B73 bzw. Mo17) wurde in den untersuchten Polymorphismen eine monoallelische

Ergebnisse

Expression des maternalen Allels detektiert (Abbildung 22) (Tabelle 10). Der Nachweis des maternalen Expressionsmusters für das imprintete Gen *MEE1* wurde infolgedessen in allen untersuchenden Proben als interne Kontrolle herangezogen.

Da das Gen *FIE1* aus Mais einem anderen Imprinting-Regulationsmechanismus unterliegt, als das Gen *MEE1*, wurde das maternal imprintete Gen *FIE1* ebenfalls in die Analysen einbezogen. In drei von vier analysierten reziproken Kreuzungen wurde eine veränderte Expression in den Chromatogrammen festgestellt und ein Einfluss der *DNG105* RNAi-Stillegung auf das maternal imprintete Gen *FIE1* gezeigt. In den allelspezifischen Expressionsanalysen der Mo17 x *dng105* RNAi Kreuzung (270/2/1; 265/7/1), ebenso wie in den mitgeführten Kontrollen, weisen die SNPs, das maternal exprimierte Allel auf. In den entsprechenden SNPs wurde das paternale Allel nicht detektiert. Im Gegensatz dazu wurde für die reziproke Kreuzungsrichtung *dng105* x Mo17 nicht das erwartete maternale Nukleotid nachgewiesen, sondern eine ausschließliche Expression des paternalen Allels (270/2/1 x Mo17) bzw. eine biallelische Expression (265/7/1 x Mo17), bei der sich die Nukleotid-Signalintensität des paternalen Allels stärker darstellte, als die des maternalen Allels. Die reziproke Kontrollhybride (Mo17 x A188) entspricht nicht vollständig dem genetischen Hintergrund (XH99) der *dng105* RNAi-Linie. Aufgrund dessen kann möglicherweise in den reziproken RNAi-Kreuzungen kein übereinstimmender Polymorphismus im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden, da nicht das A188- sondern das H99-Allel exprimiert wurde. Die analysierten SNPs aus reziproken *dng105* x B73 und den Kontrollkreuzungen, mit übereinstimmendem genetischen Hintergrund, bestätigen den Einfluss auf die maternale *FIE1* Expression der RNAi x Mo17 Kreuzung. Wie in der Mo17 x *dng105* RNAi-Kreuzung wurde das erwartete maternale Allel in den SNPs der B73 x *dng105* (267/14/1) Kreuzung ermittelt. In den amplifizierten Polymorphismen des Endosperms aus *dng105* x B73 konnte eine biallelische Expression, mit einer stärkeren Signalintensität für das maternale Allel als für das paternale Allel, detektiert werden. Zur Verifizierung der beeinflussten imprinteten *FIE1* Regulation in einer unabhängigen Analyse wurde ein zweites Endosperm-Aliquot der *dng105* (267/14/1) x B73 Kreuzung zur SMART-cDNA Amplifikation, PCR und anschließender Sequenzierung verwendet. In den wiederholten *FIE1*-Sequenzierungen konnte an den identischen SNPs der *dng105* (267/14/1) x B73 Kreuzung die biallelische Expression nicht bestätigt werden. Es wurde eine exklusive Expression des paternalen Allels detektiert. Außerdem zeigten verschiedene Pflanzen einer Linie abweichende Ergebnisse für das Gen *FIE1*. Wie bereits beschrieben, wurde in den Sequenzen der *dng105* (270/2/1) x Mo17 Kreuzung ein Einfluss auf das allelspezifische Expressionsmuster detektiert. Im Gegensatz dazu bewirkte die Suppression des *DNG105* in der *dng105* (270/5/3) x B73 Kreuzung keine regulatorische Veränderung der Imprinting-Regulation des Gens *FIE1*. Zusammenfassend konnte in keiner untersuchten B73 bzw. Mo17 x *dng105*

Ergebnisse

(264/2/4, 264/2/5, 265/7/1, 267/14/1, 270/2/1, 270/5/3) Kreuzung eine Veränderung der maternalen Imprinting-Regulation des Gens *FIE1* festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde für drei der vier analysierten *dng105* (265/7/1, 267/14/1, 270/2/1) x B73 bzw. Mo17 Kreuzungen eine Aufhebung des Imprintings oder eine Aktivierung des paternalen Allels nachgewiesen (Abbildung 22) (Tabelle 10).

Da die imprinteten Gene *MEE1* und *FIE1* maternal reguliert werden, wurden zwei neu identifizierte paternal imprintete Gene (GRMZM2G0918119 und GRMZM2G472052) (Abschnitt 8.1.2) aus Mais in die Studie einbezogen. Zur allelspezifischen Expressionsanalyse des Gens GRMZM2G0918119 konnten aufgrund der Polymorphismen-Verfügbarkeit nur die Sequenzen der reziproken Kreuzungen, die mit der Inzuchtlinie B73 durchgeführt wurden, beurteilt werden. Der Vergleich der amplifizierten SNPs aus Endosperm (6 dap) der XH99 x B73 Kontrolle und der *dng105* (267/14/1; 270/5/3) x B73 Kreuzung ergab ein übereinstimmendes paternales Expressionsmuster. Im Gegensatz dazu zeigten die SNPs aus drei unterschiedlichen Linien (264, 267, 270) der Kreuzungsrichtung B73 x *dng105* einen Einfluss der *DNG105* RNAi-Stillegung auf die Imprinting-Regulation. Die Polymorphismen der B73 x 267/14/1 Kreuzung wiesen eine biallelische Expression auf. In drei analysierten Kreuzungen mit den Linien 264 bzw. 270 wurde das maternale Allel des paternal imprinteten Gens GRMZM2G0918119 nachgewiesen. In den entsprechenden SNPs konnte keine Expression des paternalen Allels detektiert werden. Die Analysen des Gens GRMZM2G0918119 zusammenfassend wurde in beiden untersuchten *dng105* (267/14/1, 270/5/3) x B73 Kreuzungen kein Einfluss des stillgelegten *DNG105* auf die paternale Expression detektiert. In allen analysierten B73 x *dng105* (264/2/4, 264/2/5, 267/14/1, 270/5/3) Kreuzungen wurde eine Aufhebung des Imprintings oder eine Aktivierung des maternalen Allels detektiert (Abbildung 22) (Tabelle 10).

Da eine Veränderung der Imprinting-Regulation in den allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken B73 x *dng105* (267/14/1) Kreuzung für die imprinteten Gene *FIE1* und GRMZM2G0918119 nachgewiesen werden konnte, wurde diese Kreuzung ausgewählt um die imprintete Expression des Gens GRMZM2G472052 zu untersuchen. Die Analyse ergab eine Veränderung der paternalen imprinteten Expression des Gens. Die SNPs der reziproken B73 x 267/14/1 Kreuzung zeigten im Vergleich zu der reziproken B73 x XH99 Kontrollkreuzung eine biallelische Expression. In der reziproken Kreuzungsrichtung (267/14/1 x B73) wurde keine Veränderung des paternalen Imprinting-Regulationsmechanismus nachgewiesen (Abbildung 22) (Tabelle 10).

Ergebnisse

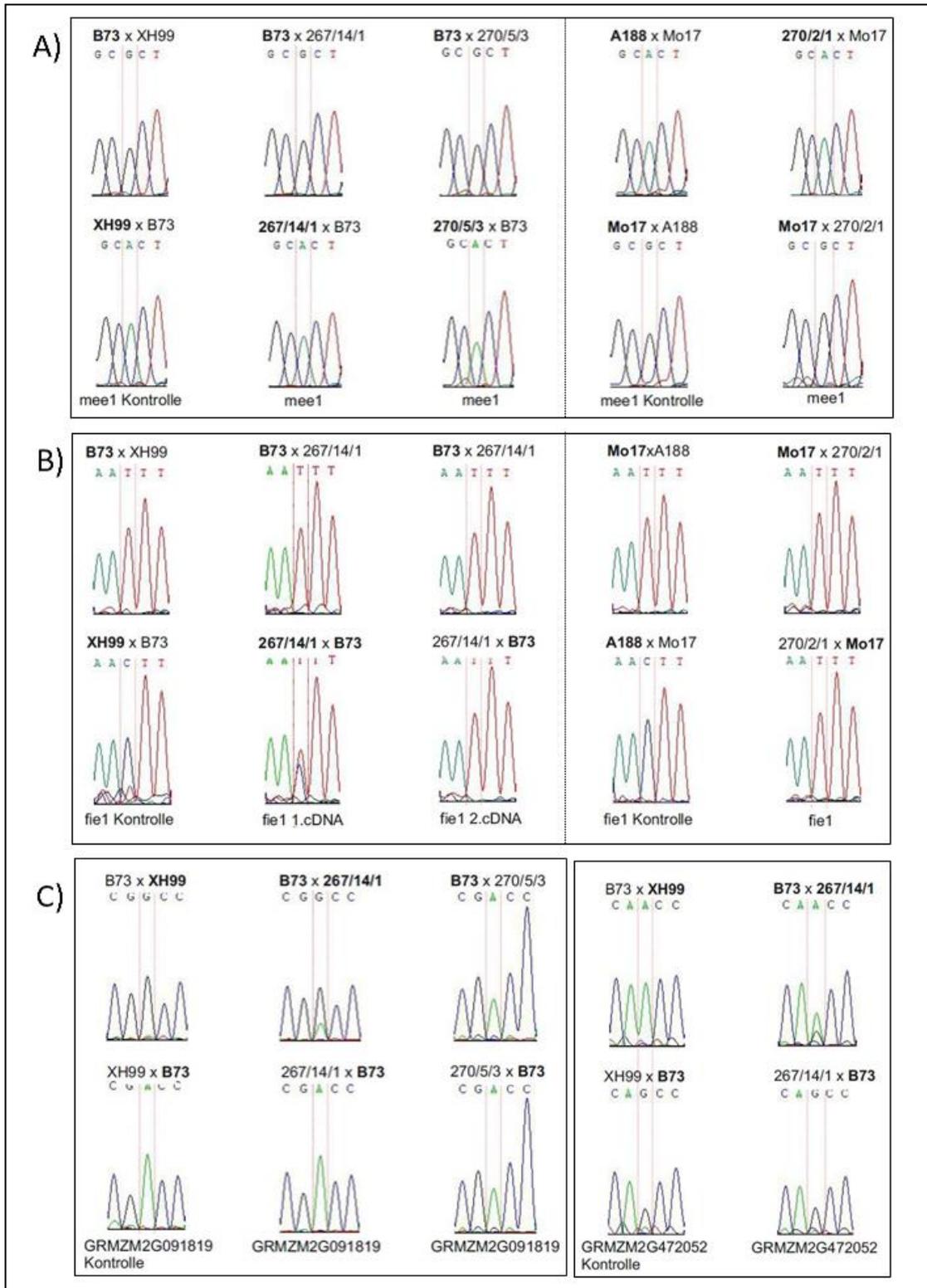


Abbildung 22: Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken *dng105* RNAi und Kontrollkreuzung für die imprinteten Gene *MEE1*, *FIE1*, GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052.

Die Chromatogramme zeigen die analysierten SNPs für die imprinteten maternalen Gene *MEE1* (A), *FIE1* (B) sowie die paternalen Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 (C) der reziproken *dng105* bzw. der Kontrollkreuzungen.

Ergebnisse

Die Chromatogramme von beiden Kreuzungsrichtungen sind jeweils untereinander angeordnet und der sich in der Mitte befindende SNP ist grafisch hervorgehoben. In der Beschriftung der Kreuzungsrichtung des jeweiligen Sequenzausschnitts ist der Genotyp hervorgehoben, dessen Nukleotid am SNP detektiert wurde.

8.3 Untersuchung zur Regulation der Expression des maternal imprinteten Gens *MEE1*

Mee1 ist das erste im Mais nachgewiesene Gen, welches eine imprintete Expression im Embryo und Endosperm aufweist (Jahnke & Scholten, 2009). Zur Charakterisierung des Gens wurde in planta die Aktivität des Promotors mithilfe des *mee1-GFP*-Fusionskonstrukts unter der Kontrolle des endogenen *MEE1*-Promotors untersucht. Außerdem wurden Analysen zur Regulation der Methylierung des imprinteten Gens in Mais-Wildtypen durchgeführt. Zur Untersuchung ob die DMR des Gens *MEE1* im Endosperm und im Embryo hemimethyliert vorliegt, wurden Methylierungsanalysen der komplementären DNA-Stränge durchgeführt. Und zur funktionellen Analyse wurde eine transgene Maislinie unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors und T-DNA-Insertionsdoppelmutanten der Homologen in *Arabidopsis* generiert, um die Auswirkungen auf die Samenentwicklung zu untersuchen.

8.3.1 Untersuchung zur Abhängigkeit der Regulation des Imprintings von *MEE1* vom genomischen Kontext

Zur Promotor- und *in vivo*-Analyse der subzellulären Lokalisation des MEE1-Proteins wurden mittels Agrobakterien-Transformation transgene *mee1:GFP* Maispflanzen hergestellt, deren Expression des Fusionsproteins mithilfe des endogenen *MEE1*-Promotors (*mee1_{Pro}*) reguliert wurde. Zur Untersuchung der Expression und Fluoreszenz des Fusionsproteins wurden molekularbiologische- und mikroskopische Analysen durchgeführt.

Die erfolgreiche Integration des *mee1_{Pro}:mee1:GFP*-Konstrukts (Abschnitt 7.2.9.1) in das Genom der Maisregenerate A12/1- A12/14 wurde über die Amplifikation eines 400 bp großen GFP-Fragments aus gDNA Blattmaterial nachgewiesen (Abbildung 23).

Ergebnisse

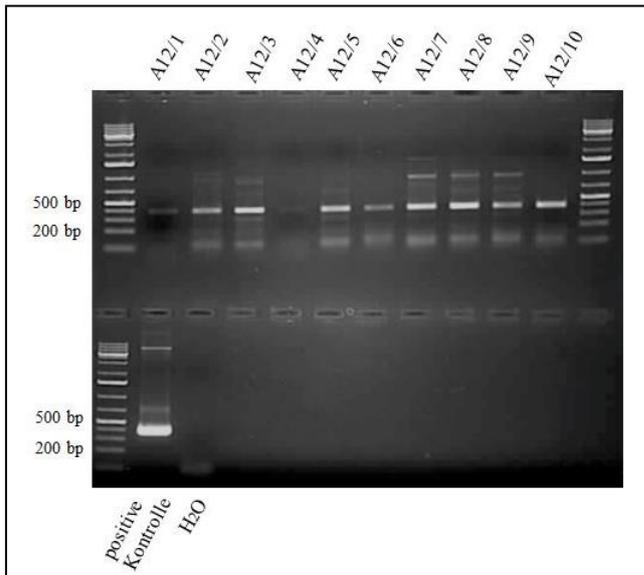


Abbildung 23: Nachweis der Integration des *meeI*_{Pro}::*meeI*:*GFP* Konstrukts in Mais.

Zur Bestätigung der Integration des Konstrukts in die Maispflanzen A12/1- A12/10 wurde die gDNA aus Blattmaterial der Regenerate isoliert und mittels PCR untersucht. Für die PCR wurden die GFP-MC4 Oligonukleotide verwendet, die ein 400 bp großes Produkt amplifizieren. Als positive Kontrolle wurde das *meeI*_{Pro}::*meeI*:*GFP* pBlue Plasmid und als negative Kontrolle Wasser getestet. Der 1 kb Plus Marker von Fermentas wurde als Größenstandard auf das 1,0%-TAE-Agarosegel aufgetragen.

Der Nachweis der Expression des Fusionsproteins erfolgte mittels einer geselbsteten *meeI*_{Pro}::*meeI*:*GFP* Maispflanze der F1-Generation (A12/4, A12/12, A12/14) sowie über *embryo rescue* erzeugtes Endosperm der F2-Generation (A12/4, A12/5, A12/7-9, A12/12, A12/14). Da das Maisregenerat A12/8 keine weibliche Blüten ausbildete, wurde der Pollen zur Bestäubung von A188 verwendet. Die Untersuchung der *GFP*-Expression in der generierten F1-Generation erfolgte über Blattmaterial der exemplarisch ausgewählten Maispflanzen [A188 x A12/8/1] und A12/14/1 mittels RT-PCR. Die erfolgreiche Expression des *GFPs* wurde durch Amplifikation eines 750 bp großen PCR-Produkts im Blatt der Pflanze A12/14/1 gezeigt. Im Gegensatz dazu konnte im Blatt der Pflanze [A188 x A12/8/1] keine *GFP*-Expression mithilfe der RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 29). Zur Analyse der Expression im Endosperm wurden die transgenen *meeI*_{Pro}::*meeI*:*GFP* Maispflanzen A12/4, A12/12, A12/14 und [A188 x A12/8/1] der F1-Generation reziprok mit A188 oder H99 gekreuzt und das 6 dap Endosperm isoliert. Die Abbildung 24 zeigt die Integration in das Genom sowie die Expression von *meeI* und *GFP* im Endosperm (6 dap) der daraus resultierten F2-Generation. In allen sechs untersuchten gDNA Endospermproben der reziproken Kreuzungen wurde *meeI* und *GFP* durch die Amplifikation eines 1222 bp großen Produkts nachgewiesen. Ebenso wurde in der cDNA in allen sechs Endospermproben *meeI* und

Ergebnisse

GFP detektiert, trotz der schwachen Bandenintensität des amplifizierten 1033 bp großen PCR-Produkts.

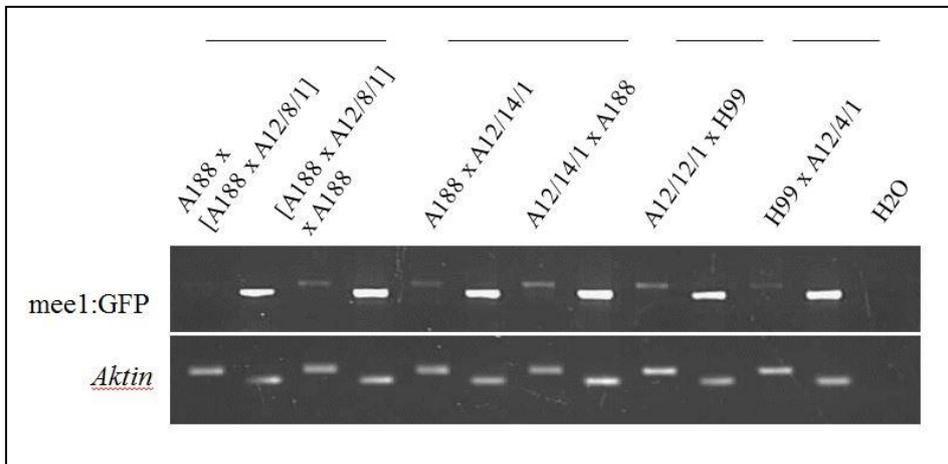


Abbildung 24: Untersuchung der Integration und Expression von $meel_{Pro}:meel:GFP$ in gDNA und cDNA aus Endosperm (6 dap).

Die gDNA und cDNA aus Endosperm (6 dap) der F2-Generation wurde auf die Integration des $meel_{Pro}:meel:GFP$ s in das Genom bzw. die Expression analysiert. In der eckigen Klammer ist die Kreuzung vermerkt, aus der die verwendete Pflanze hervorgegangen ist. Mittels der Oligonukleotide MEE1-Afl for und MEE1-GFP rev wurde *meel* und *GFP* amplifiziert. Für jede Probe wurde zuerst gDNA und dann cDNA auf das 1,5% TAE-Agarosegel aufgetragen. Zur positiven Kontrolle wurde mit den Proben ebenfalls eine Aktin-PCR und als negative Kontrolle in beiden PCRs Wasser mitgeführt. Aufgrund eines Introns im *Aktin* und im *GFP* ist das PCR-Produkt, welches aus gDNA amplifiziert wurde größer als das aus cDNA.

Die Verifizierung der Expression und die mikroskopische Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte im homozygoten Endosperm (7 dap) der F2-Generation. In den mikroskopischen Analysen konnte keine GFP-Fluoreszenz im Endosperm der geselbsteten Pflanzen [A188 x A12/4/1; 2], [H99 x A12/5/1; 2], [A188 x A12/7/1], [H99 x A12/8/2], [A188 x A12/9/1; 2], [A188 x A12/12/2] und [H99 x A12/14/2] detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde im Endosperm (7 dap) der Pflanzen [A188 x A12/4/1], [H99 x A12/8/2], [A188 x A12/12/2] und [H99 x A12/14/2] die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen. Wie in der Abbildung 33 gezeigt, wurde die *meel*- und *GFP*-Expression in cDNA mittels eines 1033 bp großen PCR-Produkts detektiert. Des Weiteren wurde die *GFP*-Expression durch Amplifikation eines 750 bp großen PCR-Produkts im Endosperm (7 dap) der Proben [H99 x A12/8/2] und [H99 x A12/14/2] verifiziert (Abbildung 29). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der *meel* Promoter in einem veränderten genomischen Kontext keine imprintete Expression hervorruft.

Ergebnisse

8.3.2 Untersuchungen zur Dynamik der DNA-Methylierung des imprinteten Gens *MEE1*

Zur Analyse der Dynamik der DNA Methylierung des imprinteten Gens *MEE1* in Mais wurde eine *Hairpin*-Bisulfit-PCR etabliert. Mit dieser Methode kann der Anteil hemimethylierter Cytosine ermittelt werden, der eine Aussage über die Geschwindigkeit der Remethylierung nach der Replikation erlaubt. Insgesamt wurden 85 amplifizierte Sequenzen aus 6 dap Maisendosperm und 7 dap Embryo analysiert. Des Weiteren wurden die komplementären Stränge, nach Entfernung der *Hairpin-Linker*-Sequenz, auf eine übereinstimmende Länge von 175 bp angeglichen. Relativ zum Transkriptionsstart von *MEE1* wurde die Genomsequenz an Position +237 bis +412 analysiert (Jahnke & Scholten, 2009). Mithilfe des Polymorphismus an Position +238 konnte eine maternale bzw. paternale Herkunft der zu untersuchenden Sequenzen ermittelt werden. Insgesamt wurden 35 maternale und 5 paternale individuelle Klone aus Endosperm bzw. 13 maternale und 14 paternale Klone aus dem Embryo untersucht. In den komplementären Strängen des Gens *MEE1* konnten 8 CG-, 7 CHG- und 23 CHH-Kontexte auf dem Plus-Strang sowie 34 CHH-Kontexte auf dem Minus-Strang analysiert werden. Ein Vergleich der amplifizierten Nukleotide der komplementären Stränge mit der Ausgangssequenz ergab eine Fehlerrate von 0,19% in Endosperm und 0,22% in Embryo. Auf der beiliegenden CD ist für jeden individuellen Klon aus Endosperm und Embryo der %-Methylierungswert der CG-, CHG- und CHH-Kontexte für den Plus- und Minus-Strang aufgeführt. Für eine Zusammenfassung der prozentualen Methylierungswerte wurde der Methylierungs-Durchschnitt für beide Gewebe in den verschiedenen Kontexten entsprechend für den Plus- und Minus-Strang ermittelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittelwerte der verschiedenen Methylierungskontexte der komplementären Stränge des Gens *MEE1*

Kontext	Endosperm				Embryo			
	maternal Plus-Strang	maternal Minus-Strang	paternal Plus-Strang	paternal Minus-Strang	maternal Plus-Strang	maternal Plus-Strang	paternal Plus-Strang	paternal Minus-Strang
CG	3,9%	1,1%	92,5%	85,0%	60,6%	60,6%	96,4%	91,1%
CHG	4,5%	3,7%	94,3%	88,6%	68,1%	65,9%	96,9%	85,7%
CHH	4,7%	4,5%	16,5%	17,1%	14,1%	12,2%	22,7%	13,7%

Zur Analyse, ob die ermittelten parentalen Methylierungen sich systematisch voneinander unterscheiden, wurde ein t-Test für die Sequenzen aus Endosperm und Embryo durchgeführt. Hierzu wurden die Kontexte des Plus- bzw. Minus-Strangs der maternalen Sequenzen mit den paternalen Sequenzen miteinander verglichen. Unterschiede im Methylierungsstatus der parentalen Kontexte wurden als signifikant ab einem p-Wert < 0.05 bewertet. In Übereinstimmung mit der

Ergebnisse

Abbildung 25) konnte im Endosperm für die Mehrzahl der untersuchten CG- und CHG-Kontexte ein signifikanter Unterschied zwischen den maternalen und paternalen Kontexten für die komplementären Stränge ermittelt werden. Im Embryo hingegen zeigten im CG- bzw. CHG-Kontext 28,6%-62,5% der analysierten Kontexte einen signifikanten Unterschied zwischen den parentalen Strängen. Der geringste signifikante Unterschied wurde im CHG-Kontext des Minus-Strangs nachgewiesen. In Endosperm und Embryo wurden wenig signifikante Unterschiede zwischen den maternalen und paternalen CHH-Kontexten in der Sequenz des Gens *MEE1* detektiert. Die ermittelten Werte des t-Tests für Endosperm und Embryo sind detailliert in einer Tabelle in der beiliegenden CD aufgeführt. Eine Zusammenfassung der untersuchten Kontexte für beide komplementären Stränge ist in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammenfassung des t-Tests: Zur Analyse, ob ein signifikanter Unterschied ($\alpha < 0.05$) zwischen den maternalen und paternalen Methylierungszuständen in den komplementären Strängen des Gens *MEE1* vorliegt.

Kontext	Endosperm				Embryo			
	Anzahl der analysierten Kontexte, Plus-Strang	Kontexte mit einem signifikanten Unterschied, Plus -Strang	Anzahl der analysierten Kontexte, Minus-Strang	Kontexte mit einem signifikanten Unterschied, Minus -Strang	Anzahl der analysierten Kontexte, Plus-Strang	Kontexte mit einem signifikanten Unterschied, Plus -Strang	Anzahl der analysierten Kontexte, Minus-Strang	Kontexte mit einem signifikanten Unterschied, Minus -Strang
CG	8	7	7	6	8	5	8	4
CHG	7	7	7	6	7	4	7	2
CHH	24	0	36	3	20	2	33	1

Eine schematische Darstellung der Methylierungszustände der Kontexte in den komplementären Strängen ist in der Abbildung 25 für Endosperm und in der Abbildung 26 für Embryo gezeigt. Die Sequenzanalyse der individuellen maternalen Klone aus Endosperm zeigte eine fast vollständige Demethylierung in allen drei Kontexten. Von 280 analysierten CG-Kontexten waren 12 Kontexte hemimethyliert. Über die Hälfte der ermittelten hemimethylierten CG-Kontexte konnten an Position 47 detektiert werden. Die Untersuchung der 210 CHG-Kontexte ergab 20 hemimethylierte CHG's, die überwiegend an Position 38, 129 und 141 ermittelt werden konnten. Im Vergleich dazu liegt die Mehrzahl der paternalen Sequenzen aus Endosperm methyliert vor. Die Analyse ergab, dass von 40 CG-Kontexten der komplementären Stränge 8 CG's hemimethyliert vorlagen. An Position 18 zeigte über die Hälfte der untersuchten CG-Kontexte eine Hemimethylierung. Des Weiteren konnte in 4 der 35 paternalen CHG-Kontexte ein Hemimethylierungsstatus ermittelt werden. Jeweils 1 hemimethylierter CHG-Kontext wurde an Position 3, 38, 129 und 146 nachgewiesen. Die Analyse der paternalen Sequenzen aus dem Embryo ergab, dass die Mehrheit der CG- und CHG-Kontexte in beiden komplementären Strängen methyliert vorlagen. Von 112

Ergebnisse

untersuchten CG-Kontexten waren 14 hemimethyliert. Jeweils 3 der 14 Kontexte wurden an Position 1, 154 und 167 detektiert. Es wurden 98 CHG-Kontexte im Plus- und Minus-Strang analysiert. Insgesamt lagen 15 CHG-Kontexte hemimethyliert vor, diese wurden hauptsächlich an den Positionen 3, 129, 141 und 146 ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigen 4 der 13 untersuchten maternalen Sequenzen fast vollständig demethylierte CG- und CHG-Kontexte in den komplementären DNA-Strängen des Gens *MEE1*. Für die anderen 9 individuellen Klone konnten überwiegend methylierte CG's und CHG's ermittelt werden. Die Analyse ergab, dass 3 von 72 CG- bzw. 63 CHG-Kontexte hemimethyliert vorlagen. Jeweils 1 hemimethylierter Kontext wurde an Position 47, 52, 102 bzw. 63, 82, und 146 in der Sequenz nachgewiesen. An Position 1 wurde für alle untersuchten maternalen Sequenzen ein vollständig demethylierter CG-Kontext amplifiziert. In drei embryonalen Klonen lagen Sequenzabschnitte mit 4-7 aufeinanderfolgenden methylierten CHH-Kontexten vor. Eine Zusammenfassung der prozentualen Hemimethylierung für vorwiegend methylierte *MEE1*-Sequenzen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Prozentuale Hemimethylierungsrate der vorwiegend methylierten Sequenzen

Gewebe / Sequenz	Cytosin-Kontext	
	CG	CHG
Endosperm / paternal	22,0%	11,40%
Embryo / paternal	12,50%	15,30%
Embryo / maternal	4,20%	4,80%

Ergebnisse

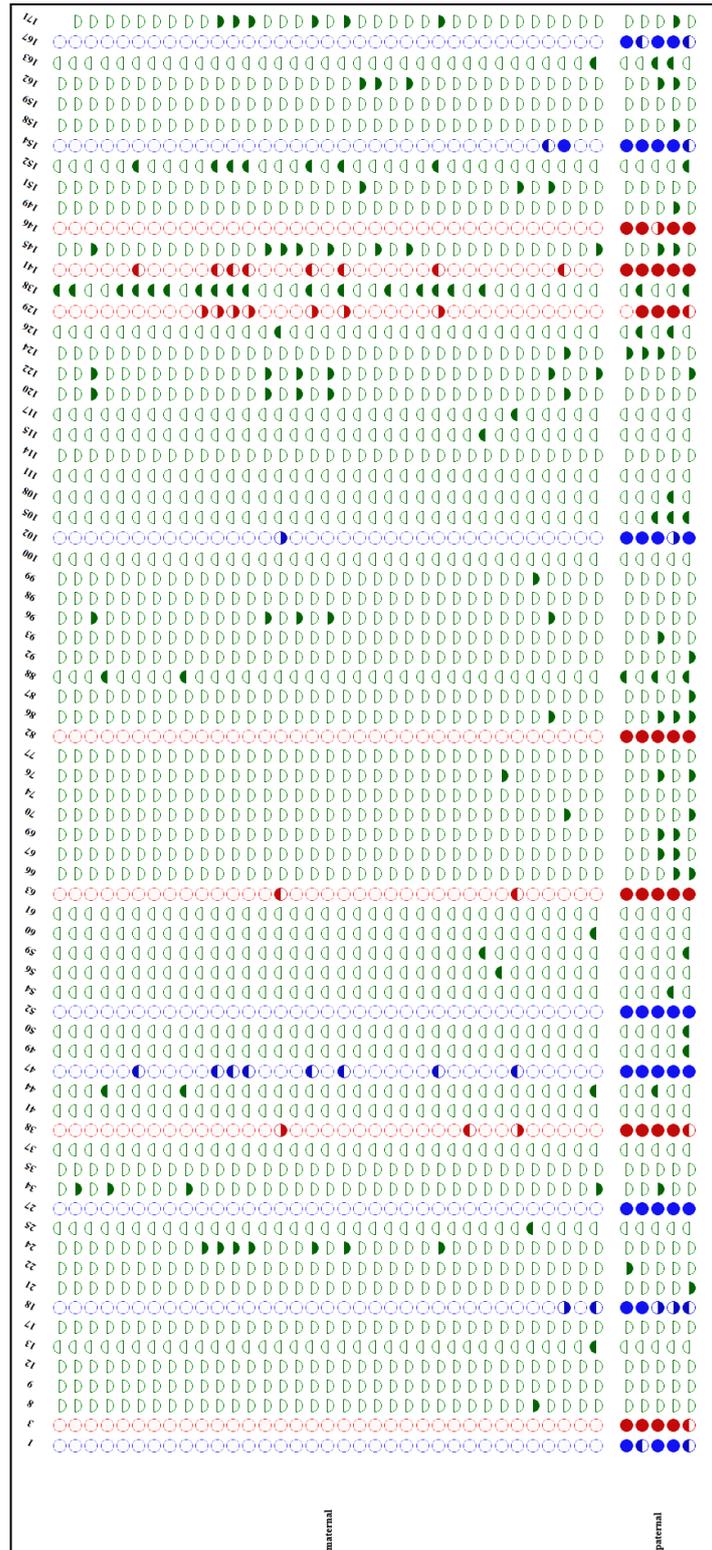


Abbildung 25: Schematische Darstellung der maternalen und paternalen Methylierungszustände in den komplementären Strängen des Gens *MEE1* im Maisendosperm.

Es sind individuelle maternale und paternale Klone aus 6 dap Endosperm dargestellt. Die Zahl entspricht der entsprechenden Position des Kontextes in der Sequenz. Die Kreise bzw. Halbkreise markieren die unterschiedlichen Methylierungskontexte. Die obere Hälfte des Kreises entspricht dem Plus-Strang und die untere Hälfte dem Minus-

Ergebnisse

Strang. Ein farblich ausgefüllter Kreis oder Halbkreis entspricht einem methylierten Kontext. Die verschiedenen Kontexte sind farblich voneinander abgesetzt. CG: blau, CHG: rot, CHH: grün.

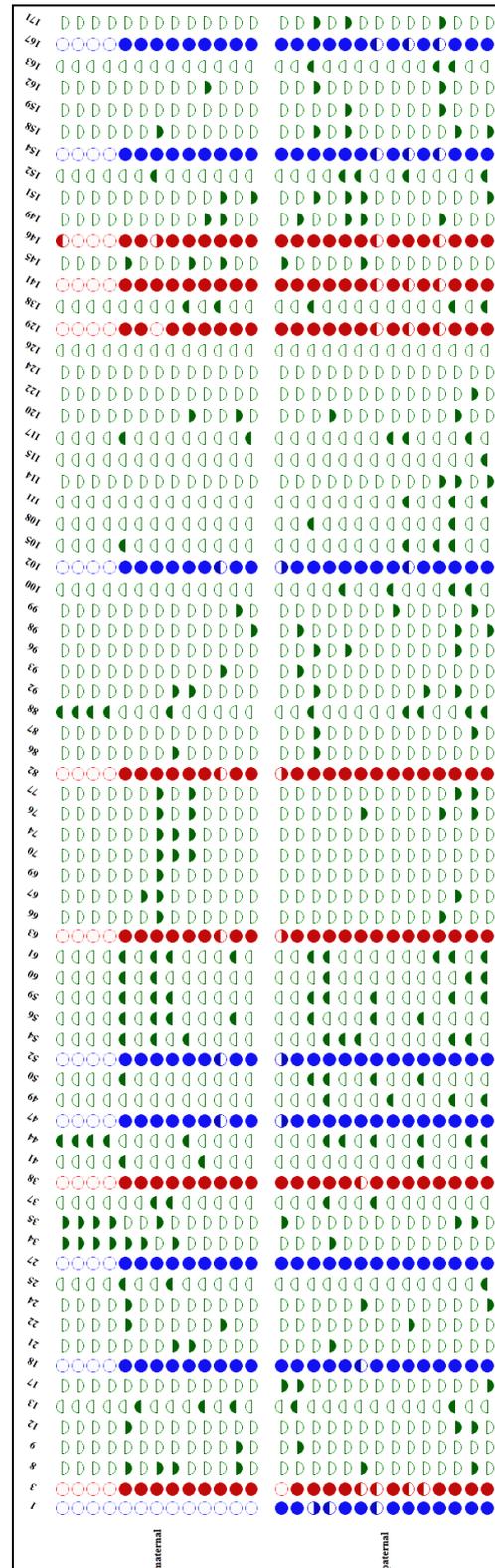


Abbildung 26: Schematische Darstellung der maternalen und paternalen Methylierungszustände in den komplementären Strängen des Gens *MEE1* Embryo.

Ergebnisse

Es sind individuelle maternale und paternale Klone aus 7 dap Embryo dargestellt. Die Zahl entspricht der entsprechenden Position des Kontextes in der Sequenz. Die Kreise bzw. Halbkreise markieren die unterschiedlichen Methylierungskontexte. Es sind individuelle maternale und paternale Klone aus dem Maisembryo dargestellt. Die obere Hälfte des Kreises entspricht dem Plus-Strang und die untere Hälfte dem Minus-Strang. Ein farblich ausgefüllter Kreis oder Halbkreis entspricht einem methylierten Kontext. Die verschiedenen Kontexte sind farblich voneinander abgesetzt. CG: blau, CHG: rot, CHH: grün.

8.3.3 Funktionelle Analyse durch Insertionsmutanten in *Arabidopsis* und Überexpression des Gens *MEE1* in Mais

Es wird vermutet, dass *MEE1* eine Funktion in der frühen Kornentwicklung ausübt. Was durch den Nachweis von kollabierten *mee1*-RNAi Maiskörnern mit einer verminderten Proteinmenge in den Befruchtungprodukten unterstützt wird (Mittelberger F., 2010). Zur Verifizierung, dass der Funktionsverlust des maternal imprinteten Gens *MEE1* zu einer Entwicklungsstörung bzw. zum Abort des Samens führt, wurden homologe Gene in *Arabidopsis* mit T-DNA-Insertionen ausgeschaltet und mikroskopisch analysiert. Des Weiteren wurden zur funktionellen Analyse *mee1:GFP* Überexpressionslinien generiert und die Expression des Fusionsproteins analysiert.

Die Untersuchungen, ob ein Funktionsverlust des Gens *MEE1* eine Störung in der frühen Samenentwicklung bewirkt, wurden mit homologen Genen in *Arabidopsis* durchgeführt. Mithilfe der Datenbank Gramene (#36b, <http://www.gramene.org/>) (Youens-Clark *et al.*, 2010 // 2011) wurden die orthologen Gene AT3G11600 und AT5G06270 in *Arabidopsis* zu *MEE1* aus Mais (AC219159.3_FGT002) ermittelt. Laut der Datenbank TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) (Lamesch *et al.*, 2011) ist die molekulare Proteinfunktion für beide Gene unbekannt. Für AT3G11600 wird eine Involvierung in die Karrikin-Antwort vorhergesagt und AT5G06270 konnte in Chloroplasten lokalisiert werden. Über das European Arabidopsis Stock Centre (uNASC, <http://arabidopsis.info/>) wurden für das Gen AT3G11600 die T-DNA-Insertionslinien SALK_048394 und SALK_093234 mit einer Insertion im Promotor des Gens auf Chromosom 3 an Position 3667345 bzw. 3666926 bezogen. Für AT5G06270 wurden die Insertionslinien SALK_089888 und SALK_042914 mit einer Insertion im zweiten Exon des Gens auf Chromosom 5 an Position 1913137 bzw. 1913161 ausgewählt. Aufgrund der vermuteten embryonalen Letalität bei Verlust beider Gene wurden Doppelmutanten mit einer homozygoten und einer heterozygoten Insertion für die Analysen generiert. Für die Untersuchungen wurden die Doppelmutanten SALK_093234 (Homozygot) x SALK_042914 (Heterozygot) und SALK_093234 (Heterozygot) x SALK_042914 (Homozygot) ausgewählt. Über die Selbstung der ausgewählten homozygoten:heterozygoten Doppelmutanten wurden 25% Doppel-Knock-out-Samen erzeugt. Die Untersuchung der phänotypischen Aufspaltung der Nachkommen wurde für beide Doppelmutanten in insgesamt 60 Schoten durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der

Ergebnisse

Samenentwicklung zwischen den Samen der Doppelmutanten und dem Wildtyp (Col-0) in der mikroskopischen Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 27).

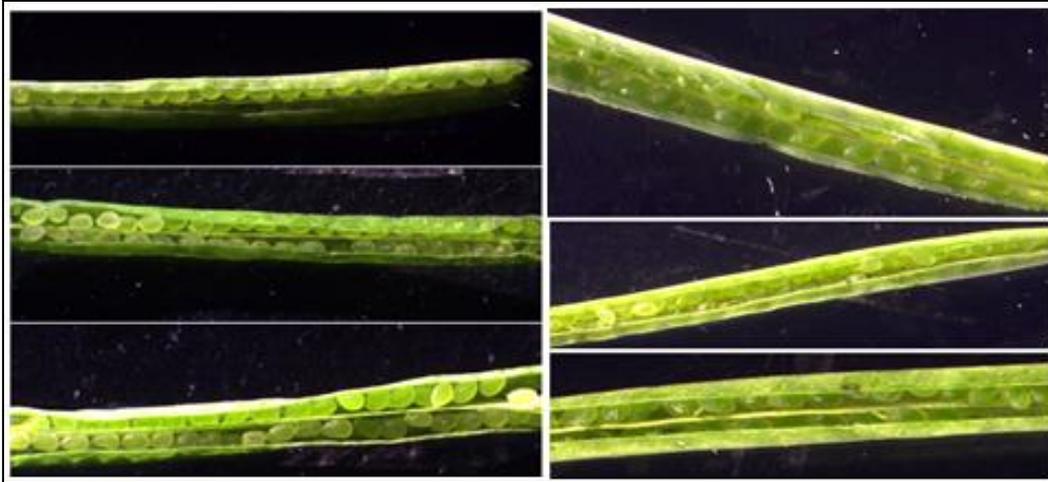


Abbildung 27: *Arabidopsis* Schoten der Doppelmutanten SALK_093234 x SALK_042914 und SALK_093234 x SALK_042914 sowie vom Wildtyp Col-0.

Die linke Seite der Abbildung zeigt exemplarische Beispiele der untersuchten Schoten auf die Samenentwicklung der geselbsteten Doppelmutanten SALK_093234 (Homozygot) x SALK_042914 (Heterozygot) und SALK_093234 (Heterozygot) x SALK_042914 (Homozygot). Als Kontrolle dienten die Samen des Wildtyps Col-0, die auf der rechten Seite der Abbildung 27 dargestellt sind.

Zur Charakterisierung des MEE1-Proteins und um die Auswirkung einer Überexpression des Gens auf die Pflanzen- bzw. Samenentwicklung zu untersuchen, wurden Überexpressionslinien in Mais erzeugt. Mittels biolistischer Transformation wurden fünf transgene Überexpressionslinien (244-246, 248, 249) generiert, deren Expression des Gens *MEE1* mittels des konstitutiven 35S-Promoters reguliert wird. Die erfolgreiche Integration des 35S:hsp70:mee1:GFP Konstrukts (Abschnitt 7.2.9.1) konnte für alle 16 untersuchten Pflanzen (244/1; 245/1-5; 246/1-3; 248/1-2, 4; 249/1-3), trotz schwacher Bandenintensität, durch die Amplifikation eines 114 bp großen GFP-Fragments gezeigt werden (Abbildung 28). Mittels cDNA der exemplarisch ausgewählten Maisregenerate 244/1 und 245/2 sowie der Pflanzen 244/1/1,2 und 245/2/1, 2 der F1-Generation wurde die Expression des Fusionsproteins untersucht. Eine schwache Expression im Maisblatt des Regenerats 245/2 wurde über die Amplifikation eines 750 bp großen GFP PCR-Produkts detektiert. Im Gegensatz dazu konnte für die Maispflanzen 244/1/1,2 und 245/2/1, 2 keine Expression des Fusionsproteins mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 29). In den mikroskopischen Analysen konnte keine GFP-Fluoreszenz in den Maispflanzen der F1-Generation detektiert werden.

Ergebnisse

Hierzu wurde Blattmaterial sowie junge Wurzelspitzen von je 10 Maispflanzen der Überexpressionslinien 244/1; 245/1, 2; 246/1, 2; 248/1-2 und 249/1,2 auf die GFP-Fluoreszenz untersucht. Da in den 35S:hsp70:mee1:GFP Überexpressionslinien keine kontinuierliche, starke *mee1:GFP* Expression und Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, wurde die transgene Linie für keine weiteren Analysen verwendet.

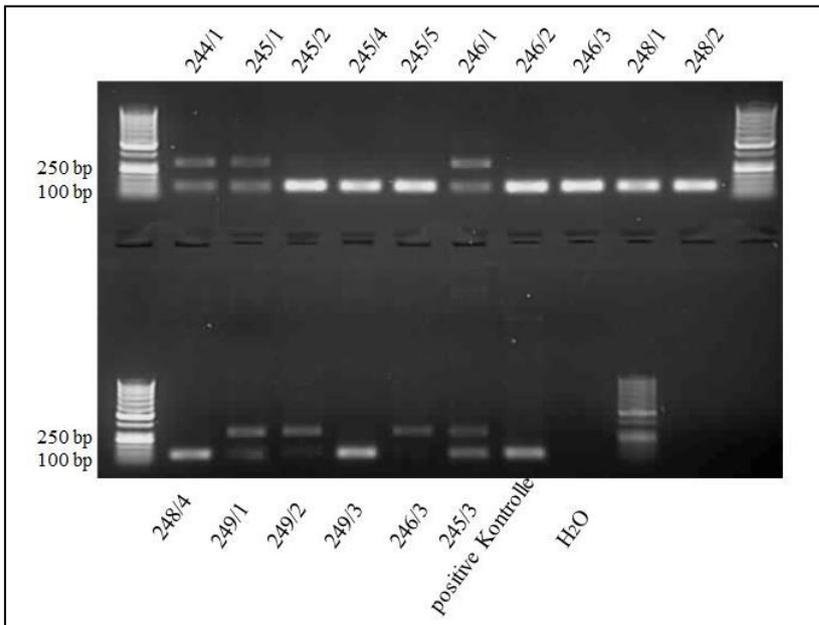


Abbildung 28: Nachweis der Integration des 35S:hsp70:mee1:GFP Konstrukts in die Maisregenerate.

Zur Bestätigung der Integration des Konstrukts in die Regenerate 244/1; 245/1-5; 246/1-3; 248/1-2, 3; 249/1-3 wurde die gDNA aus Blattmaterial isoliert und mittels PCR untersucht. Als positive Kontrolle wurde das 35S:hsp70:mee1:GFP pMon-Plasmid und als negative Kontrolle Wasser eingesetzt. Mittels der Oligonukleotide GFP-P3 for und rev wurde ein 114 bp großes Produkt amplifiziert. Als Größenstandard wurde der 50 bp-Marker von Fermentas auf das 1,5%-TAE-Agarosegel aufgetragen.

Ergebnisse

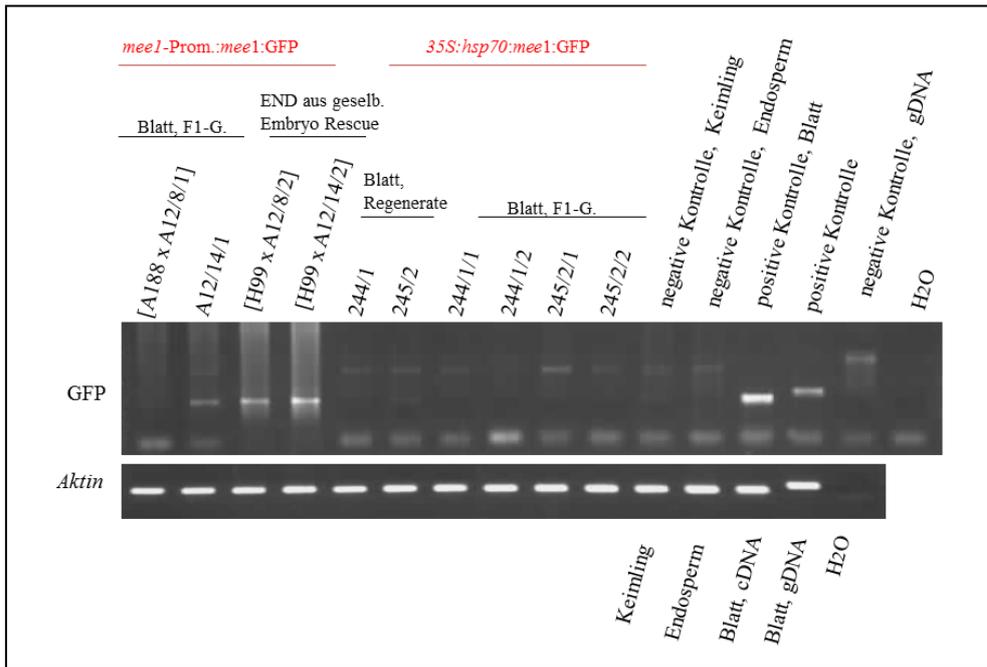


Abbildung 29: Analyse der GFP-Expression in Blatt und Endosperm der transgenen $mee1_{pro}:mee1:GFP$ und $35S:hsp70:mee1:GFP$ Pflanzen.

Mittels PCR wurde die Expression von *GFP* in Blatt und Endosperm der transgenen $mee1_{pro}:mee1:GFP$ und $35S:hsp70:mee1:GFP$ Maispflanzen analysiert. In der eckigen Klammer ist die Kreuzung vermerkt, aus der die verwendete Pflanze hervorging, der Nachkomme wurde im Anschluss geselbstet und für die Analysen verwendet. Zur negativen Kontrolle wurde cDNA aus Keimlingen, Endosperm und gDNA aus Blatt sowie Wasser eingesetzt. Zur GFP-Amplifikation wurden in der PCR die Oligonukleotide K-GFP- for und rev verwendet. Als GFP positive Kontrolle diente cDNA aus Blatt der transgenen S1/2 Pflanze und das pMon *mee1:GFP* Plasmid. Außerdem wurde zur Kontrolle der Proben eine Aktin-PCR durchgeführt. Aufgrund eines Introns im *Aktin* sowie im *GFP* ist das PCR-Produkt, welches aus gDNA amplifiziert wurde größer als das PCR-Produkt der cDNA. Abkürzungen: END: Endosperm, geselb.: geselbstet, F1-G: erste filiale Generation

9 Diskussion

9.1 Syntenisch orthologe Gene in Reis und Mais zeigen eine konservierte Imprinting-Regulation

Angiospermen sind die heute am weitesten verbreitetste und artenreichste Pflanzengruppe. Monokotyle und dikotyle Pflanzen trennten sich vor ca. 150-250 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorfahren (Abrouk *et al.*, 2010). Eine evolutionäre Entwicklung vor 65 Millionen Jahren führte zur Divergenz der beiden Monokotylen Reis und Mais (Abrouk *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Konservierung der elternabhängigen Genexpression im Endosperm zwischen den zwei monokotylen Reis und Mais untersucht. Erste Hinweise auf eine Konservierung der Imprinting-Regulation zwischen verschiedenen Spezies in Pflanzen zeigte die Identifikation der Reisgene *OsFIE1* und *OsMADS87*, die eine Sequenzhomologie zu dem imprinteten Gen *FIE1* in Mais bzw. zu dem imprinteten Gen *PHERES1* in *Arabidopsis* aufweisen (Luo *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2011).

Die Identifikation von putativ imprinteten Maisgenen in der vorliegenden Arbeit basierte auf syntenisch orthologen imprinteten Genen in Reis (Luo *et al.*, 2011). Die verwendete Methode zur Identifikation von imprinteten Genen mittels allelspezifischer Expressionsanalyse ist abhängig von Polymorphismen zwischen den verschiedenen Maisinzuchtlinien der reziproken Kreuzungen. Dies schließt die Analyse von putativ imprinteten Genen aus, für die kein Polymorphismus detektiert werden konnte. Die Verifizierung der Methode erfolgte über den Nachweis allelischer Expressionsmuster der bekannten imprinteten Gene *FIE1*, *MEE1* und *MEG1* in Mais (Danilevskaya *et al.*, 2003; Gutierrez-Marcos *et al.*, 2003; Gutierrez-Marcos, 2004; Jahnke & Scholten, 2009). Eine Bestätigung der Imprinting-Regulation, der in dieser Arbeit identifizierten imprinteten Gene, erfolgte über den Vergleich der Chromatogramme der Inzuchtlinien mit den reziproken Kreuzungen an der Position des Polymorphismus. Für eine weitere Unterstützung der Methode wurden die identifizierten imprinteten Gene aus Proben mit identischen Mengenverhältnissen von zwei Genotypen amplifiziert. Die Genotypen wurden entsprechend der reziproken Kreuzung gewählt, in der für das zu untersuchende Gen ein Imprinting nachgewiesen werden konnte. Für die Mehrzahl der Gene konnte eine nahezu übereinstimmende Nukleotid-Signalintensität am Polymorphismus detektiert werden. Bei einigen wenigen Genen konnte lediglich ein Allel am Polymorphismus detektiert werden, was auf eine bevorzugte Amplifikation eines der beiden Allele hindeutet. Für die entsprechenden Gene konnte jedoch in den reziproken Kreuzungen aus Endosperm ein imprintetes Expressionsmuster nachgewiesen werden. Dies weist auf eine besonders starke Expression des jeweiligen imprinteten Allels hin. Insgesamt konnten von

Diskussion

56 untersuchten Maisgenen mittels der allelspezifischen Expressionsanalyse 12 nicht imprintete sowie vier maternal und sechs paternal imprintete Gene in Mais identifiziert werden. 34 Gene konnten entweder nicht über RT-PCR amplifiziert werden oder eine Auswertung was aufgrund der Sequenzqualität bzw. nicht vorhandener Polymorphismen nicht möglich. Es wurde gezeigt, dass unter Ausnutzung der Syntenie zwischen verschiedenen Spezies neue imprintete Gene identifiziert werden können.

Das Ausmaß der Konservierung der allelspezifischen Expression zwischen homologen Genen in monokotylen Pflanzen wurde über den Imprinting-Status der für diese Arbeit ausgewählten imprinteten Reisgene mit den analysierten syntenisch orthologen Gen in Mais verglichen. Die Analyse ergab, dass für 10 von 18 analysierten imprinteten Reisgenen (Luo *et al.*, 2011) mindestens ein imprintetes Gen in Mais identifiziert werden konnte. Demzufolge wurde eine Übereinstimmung der Imprinting-Regulation von 56% zwischen Reis und Mais ermittelt. Dieses Ergebnis deutet auf eine hohe Konservierung der allelspezifischen Expression zwischen den zwei monokotylen Gräsern hin. Im Gegensatz dazu wird der Umfang der Konservierung von imprinteten Genen in den Spezies *Arabidopsis*, Reis und Mais bisher als limitiert betrachtet (Ikeda, 2012). Mithilfe der genomweiten allelspezifischen RNA-Tiefensequenzierungen in Endosperm aus *Arabidopsis*, Reis und Mais konnten insgesamt 896 imprintete Gene identifiziert werden (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; McKeown *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Im Unterschied zu der in der vorliegenden Arbeit ermittelten 56%igen Übereinstimmung der Imprinting-Regulation zwischen Reis und Mais ergab der Vergleich der Gen-Daten der beiden monokotylen Pflanzen 15 homologe Gene mit einer konservierten Imprinting-Regulation im Endosperm (Luo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Aufgrund der Gesamtmenge von 344 untersuchten imprinteten Gene, deutet dies auf eine geringere Konservierung zwischen Reis und Mais hin. Dieser Unterschied der Analyseergebnisse der beiden Untersuchungen, welche auf dem Vergleich mit den Daten aus Reis derselben Studie (Luo *et al.*, 2011) basieren, könnte sich auf die größere Zahl von untersuchten Genotypkombinationen in der vorliegenden Arbeit und verschiedenen Entwicklungsstadien des Endosperms zurückführen lassen. Zur Untersuchung einer Konservierung imprinteter Gene zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen schlossen die in Mais durchgeführten Analysen fünf Reisgene ein, für die imprintete orthologe Gene in *Arabidopsis* identifiziert wurden (Luo *et al.*, 2011). Für drei der fünf imprinteten Reisgene konnte ein imprintetes orthologes Gen im Maisendosperm ermittelt werden. Der Vergleich von drei Datensätzen aus RNA-Tiefensequenzierungen mit 400 imprinteten Genen aus *Arabidopsis* (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011) zu 165 imprinteten Genen aus Reis (Luo *et al.*, 2011) zeigte für 27 Gene eine signifikante Sequenzhomologie und folglich eine putative Konservierung der Imprinting-Regulation (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011;

Diskussion

Luo *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011). Ein Vergleich der Gen-Daten aus *Arabidopsis*, Reis und Mais konnte zudem für drei weitere homologe Gene eine übereinstimmende Imprinting-Regulation nachweisen (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Diese Daten zeigen eine hohe Konservierung der allelspezifischen Genexpression zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen, da sich die unterschiedlichen Spezies *Arabidopsis*, Reis und Mais vor ca. 150-250 Millionen Jahren bzw. 65 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorfahren trennten (Abrouk *et al.*, 2010). Die Auswertungen der RNA-Tiefensequenzierungsdaten aus *Arabidopsis*, Reis und Mais bereits existierender Arbeiten, basieren alle auf unterschiedlichen bioinformatischen Methoden. Es wurde ein Vergleich der Daten mittels übereinstimmender bioinformatischer Methoden bzw. ein Vergleich von nicht-gefilterten Datensätzen durchgeführt (Jiang & Kohler, 2012; Köhler *et al.*, 2012). Dadurch wurden zwischen den verschiedenen Datensätzen aus *Arabidopsis* drei Mal mehr gemeinsame imprintete Gene identifiziert und acht Gene mit einer Konservierung der Imprinting-Regulation zwischen *Arabidopsis* und Reis ermittelt (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Jiang & Kohler, 2012; Köhler *et al.*, 2012). Die unterschiedlichen bioinformatischen Auswahlkriterien der Studien haben einen Einfluss auf die Anzahl der identifizierten konservierten imprinteten Gene. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine höhere Anzahl imprinteter Gene die eine Konservierung der Imprinting-Regulation zwischen unterschiedlichen Spezies zeigen, als bisher bekannt. In Bezug auf die geringe Gesamtanzahl imprinteter Gene in Pflanzen ist die Überschneidung konservierter Gene hoch signifikant (Jiang & Kohler, 2012).

Für die in der vorliegenden Arbeit identifizierten drei Gene mit homologen imprinteten Genen in *Arabidopsis*, Reis und Mais wurde untersucht ob neben der Konservierung der Imprinting-Regulation ebenfalls die Genfunktion konserviert ist. Die Analyse ergab, dass das konservierte Gen GRMZM2G178435 für ein putatives *required to maintain repression 1*-Protein und das Gen GRMZM5G871520 für eine Serin/Threonin-Proteinkinase codiert. Zudem wurde GRMZM2G091819 als eine konservierte Flavin Monooxygenase *YUCCA10* (*YUC10*) nachgewiesen, die während der Embryogenese in den Auxin-Transport involviert ist (Ikeda, 2012). Die beim Vergleich der Daten aus RNA-Tiefensequenzierungen in *Arabidopsis*, Reis und Mais ermittelten drei konservierten imprinteten Gene wurden ebenfalls in die Untersuchung eingeschlossen (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit identifizierten konservierten *YUC10* (GRMZM2G091819) wurde in den Daten der RNA-Tiefensequenzierungen aus *Arabidopsis*, Reis und Mais eine übereinstimmende Imprinting-Regulation für ein ARID/BRIGHT DNA-Bindedomäne-Protein codierendes Gen (GRMZM2G365731) sowie ein 5-Methylcytosin-Bindeprotein *VARIANT IN METHYLATION 5* (*VIM5*) codierendes Gen (AC191534.3) ermittelt (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Waters

Diskussion

et al., 2011; Zhang *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen des ARID/BRIGHT DNA-Bindedomäne-Proteins (GRMZM2G365731) nicht analysiert, da es nicht zu den ausgewählten Genen gehörte, die mittels allelspezifischer Expressionsanalysen untersucht wurden. Die imprintete Expression des Gens *VIM5* die beim Vergleich der Daten der RNA-Tiefensequenzierungen ermittelt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit mittels allelspezifischer Expressionsanalysen nicht gezeigt werden. Für die Daten der RNA-Tiefensequenzierung wurde das orthologe Gen AC191534.3 in Mais (Zhang *et al.*, 2011) zu *VIM5* aus Reis und *Arabidopsis* analysiert, wohingegen in dieser Arbeit die orthologen Gene GRMZM2G461447 sowie GRMZM2G339151 in Mais untersucht wurden. Es wurden fünf imprintete Gene mit einer konservierten Funktion zwischen den Spezies *Arabidopsis*, Reis und Mais ermittelt. Diese Konservierung lässt vermuten, dass diese imprinteten Gene essenzielle Funktionen in der Samenentwicklung ausüben, die den Pflanzen einen selektiven Vorteil verleihen, da die Imprinting-Regulation der Gene mit ihren entsprechenden Funktion nach der Trennung von monokotylen und dikotylen Pflanzen aufrechterhalten wurden. Es wurden erste Hinweise auf die Regulation der hoch konservierten Gene *VIM5* und *YUC10* mittels Untersuchungen mit *fiel*-Mutanten in *Arabidopsis* gezeigt. Für beide paternal exprimierten, imprinteten Gene konnte eine Aktivierung des stillgelegten maternalen Allels detektiert werden (Hsieh *et al.*, 2011). Das deutet darauf hin, dass das maternale Allel im Wildtyp-Endosperm über den PRC2-Komplex stillgelegt wird (Hsieh *et al.*, 2011). Es bleibt interessant, ob für die imprinteten Gene neben der Regulation auch die Funktion zwischen verschiedenen Spezies aufrechterhalten wird und eine PRC2-vermittelte Regulation von imprinteten Genen zwischen Monokotylen und Dikotylen konserviert ist.

Die bekannten imprinteten Gene in Mais *FIE2* und *MEG1* zeigen eine transiente imprintete Expression im Endosperm (Danilevskaya *et al.*, 2003; Gutierrez-Marcos, 2004). Eine vorübergehende imprintete Genexpression ist auch in Säugern bekannt. In Maus wurden Gene identifiziert, deren Imprinting-Status eine Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Gehirns zeigt (Gregg *et al.*, 2010). Zur Überprüfung einer transient imprinteten Expression für die in 6 dap Endosperm identifizierten imprinteten Gene wurde untersucht, ob für die Gene ebenfalls eine Imprinting-Expression in 10 und 14 dap gezeigt werden konnte (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Die Untersuchung ergab, dass für die Gene GRMZM2G472052 und *YUC10* ebenfalls in 10 und 14 dap Maisendosperm ein paternales Imprinting detektiert wurde (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Des Weiteren zeigen Ergebnisse aus Expressionsanalysen für das Gen *YUC10* eine imprintete Expression in 20 dap Maisendosperm (Zhang *et al.*, 2011), was auf eine stabile Imprinting-Expression im Endosperm hindeutet. Im Unterschied dazu konnte für die restlichen, in 6 dap Maisendosperm identifizierten Gene, ausschließlich in der frühen Endospermentwicklung eine Imprinting-Expression nachgewiesen werden. Folglich entspricht die für die Mehrheit der

Diskussion

untersuchten Gene zeigte transiente Imprinting-Regulation der transienten Expression der bekannten imprinteten Gene *FIE2* und *MEG1* in Mais (Danilevskaya *et al.*, 2003; Gutierrez-Marcos, 2004). Diese transiente Imprinting-Regulation in Mais wird durch Ergebnisse aus *Arabidopsis* unterstützt, bei dem für kein Gen in 3-5 bzw. 7-8 dap Endosperm eine gemeinsame imprintete Expression in beiden Entwicklungsstadien detektiert werden konnte (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; McKeown *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011). In Reis wurde hingegen lediglich für eine limitierte Anzahl der analysierten Gene ein Verlust der Imprinting-Regulation im sich entwickelnden Reisedosperm gezeigt (Luo *et al.*, 2011). Dementsprechend konnte für Mais eine überwiegend transiente Imprinting-Expression nachgewiesen werden, wohingegen in Reis die Imprinting-Expression während der Samenentwicklung aufrechterhalten wird. Die beiden monokotylen Pflanzen könnten somit unterschiedliche Regulationsprozesse in der Samenentwicklung durchlaufen, obwohl sowohl Mais als auch Reis über ein persistentes Endosperm verfügen (Baroux *et al.*, 2002). Die Beobachtungen der verschiedenen Zeitpunkte der Imprinting-Expression in *Arabidopsis*, Reis und Mais zeigen eine dynamische Veränderung der Expression im Laufe der Endospermentwicklung. Die Mehrzahl der untersuchten Gene in Maisendosperm zeigte eine transiente Imprinting-Expression, die in der frühen Samenentwicklung (6 dap) detektiert werden konnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten allelspezifischen Expressionsanalysen wurden in fünf unterschiedlichen Genotypkombinationen reziproker Hybride durchgeführt. Für jedes analysierte Gen in Mais wurde untersucht in wie vielen Genotypkombinationen ein übereinstimmendes Imprinting-Ergebnis amplifiziert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnten 15 Gene nur in einer Genotypkombination auf das amplifizierte allelische Expressionsmuster untersucht werden, da kein PCR-Produkt amplifiziert wurde oder eine Auswertung aufgrund der Sequenzqualität bzw. nicht verfügbarer Polymorphismen nicht möglich war. Für vier nicht-imprintete Gene (GRMZM2G469162, GRMZM2G371277, GRMZM2G453655, GRMZM2G339151) konnte die biallelische Expression in einer weiteren und für ein nicht-imprintetes Gen (GRMZM2G418515) in zwei anderen Genotypkombinationen bestätigt werden. Für ein maternal imprintetes (GRMZM2G145300) und ein paternal imprintetes Gen (GRMZM5G897988) wurde in einer weiteren Genotypkombination eine biallelische Expression ermittelt. Demzufolge konnte für diese Gene das allelische Expressionsmuster in unterschiedlichen Genotypkombinationen in Maisendosperm bestätigt werden. Andere Gene hingegen zeigten ausschließlich in einer definierten Genotypkombination eine Imprinting-Regulation. Ein Vergleich von RNA-Tiefensequenzierungen in Mais und *Arabidopsis* unterstützt die Beobachtungen dieser Arbeit, dass Imprinting genotypabhängig ist (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Für das Gen *YUC10* konnte eine Imprinting-Genexpression in zwei

Diskussion

weiteren Genotypkombinationen in Maisendosperm bestätigt werden, während für die Mehrzahl der Gene eine Imprinting-Regulation in keiner anderen Genotypkombination nachgewiesen wurde (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Diese regulatorische Variation der Gene in verschiedenen Genotypkombinationen steht im Einklang mit dem hohen Grad an Sequenzvariabilität aufgrund von SNPs, Insertionen und Deletionen zwischen den unterschiedlichen Inzuchtlinien in Mais (Lai *et al.*, 2010). Des Weiteren kann die Vielfältigkeit in der Genexpression das Ergebnis von Variationen in cis- bzw. trans-Elementen sein (Springer & Stupar, 2007). Diese Hypothese wird durch eine natürliche Variation epigenetischer Zustände wie z.B. der DNA-Methylierung von Genen oder variierende transkribierte Gensets zwischen verschiedenen Inzuchtlinien untermauert (Makarevitch *et al.*, 2007; Hansey *et al.*, 2012). Infolgedessen haben die unterschiedlichen Genotypen einen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der analysierten Gene bzw. der verschiedenen Spezies. Gene die nur in einer definierten Genotypkombination eine Imprinting-Regulation zeigen, könnten ein allelspezifisches Imprinting aufweisen. In diesem Fall zeigt die Imprinting-Expression, im Unterschied zum genspezifischen Imprinting, eine Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund (Gehring *et al.*, 2004). Andererseits deutet diese Abhängigkeit von der Genotypkombination auf eine Parallelevolution (Parallelismus) imprinteter Gene in unterschiedlichen Genotypen hin. In der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin vier paraloge Gene in Mais untersucht, die ein übereinstimmendes Imprinting bzw. eine nicht-imprintete Expression zeigten, sowie Gene deren paraloge Gene keine Imprinting-Expression aufwiesen. Diese paralogen Gene mit einem übereinstimmenden Imprinting in einer Spezies könnten die Fitness einer Pflanze erhöhen, indem Mutationen in einem der paralogen Gene, welche einen Verlust der Funktion zur Folge haben, durch das andere paraloge Gen kompensiert bzw. über alternative Stoffwechselwege den Verlust ausgeglichen wird (Gu *et al.*, 2003). In den Genpaaren für die ein imprintetes und ein nicht-imprintetes Gen nachgewiesen werden konnte, könnte eine Genduplikation mit nachfolgender Divergenz stattgefunden haben. Beide untersuchten Genpaare zeigen in einem paralogen Gen in Mais eine maternal imprintete Expression. Diese maternal imprinteten Gene könnten sich evolutionär entwickelt haben. Ein höherer Anteil an maternal imprinteten Genen als an paternal imprinteten Genen, kann zu einem größeren maternalen Einfluss auf die Entwicklung der Nachkommen und dies wiederum zu einem Vorteil für die Mutterpflanze geführt haben. Diese evolutionäre Entwicklung von maternalen Genen wird durch die unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Gene *FIE1* und *FIE2* aus Mais unterstützt, deren Divergenz zu einer verstärkten mütterliche Kontrolle über die Samenentwicklung geführt haben kann (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006; Dickinson *et al.*, 2012). Die vorliegende Arbeit und eine weitere Studie konnten mehr paternal als maternal imprintete Gene im Endosperm identifizieren (Zhang *et al.*, 2011). Das könnte darauf hindeuten, dass Imprinting eine Funktion in der Dosis-Kompensation hat

Diskussion

(Zhang *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde ein Gen identifiziert, das in Reis eine paternale Imprinting-Regulation zeigt und in Mais maternal imprintet ist. Die Expression des entgegengesetzten elterlichen Allels wurde ebenso für das bekannte maternal imprintete Reisgen *OsMADS87* und dem orthologen paternal imprinteten Gen *PHERES1* in *Arabidopsis* beobachtet (Luo *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2011). Weitere Gene mit einem unterschiedlich parentalen Imprinting konnten für einige konservierte imprintete Homologe zwischen *Arabidopsis*, Reis und Mais nachgewiesen werden (Luo *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Insbesondere beim Vergleich von Homologen imprinteter Genen zwischen *Arabidopsis* und Reis zeigten 14 von 37 Orthologe, ebenso wie mehrere paraloge Gene in Reis eine Expression des entgegengesetzten elterlichen Allels (Köhler *et al.*, 2012). Da dieser Wechsel der allelspezifischen Expression in monokotylen und dikotylen Pflanzen kein Einzelfall ist, lässt sich ein Selektionsvorteil vermuten, der eine bessere Anpassung an die Umwelt bietet oder durch Veränderungen des Expressionslevels bzw. der Funktion zu einer leichteren Kontrolle über die Samenentwicklung führt. Die Expression des entgegengesetzten elterlichen Allels in einer anderen Spezies ist nicht mit der parentalen Konflikttheorie (Haig & Westoby, 1989) vereinbar. Ein Wechsel von einem maternal imprinteten Gen zu einem paternal imprinteten Gen würde die Nährstoffzufuhr in Abhängigkeit des paternalen Imprintings zu bestimmten Nachkommen fördern, wodurch die Überlebensfähigkeit nicht mehr für alle Samen bzw. Nachkommen in gleichem Maß gewährleistet wäre. Für diese Gene könnte die Imprinting-Richtung nebensächlich und nur relevant sein, dass das Gen über einen Imprinting-Mechanismus reguliert wird. Das könnte auf ein unabhängig entstandenes analoges Merkmal oder auf eine nicht essenzielle Funktion in der Samenentwicklung hindeuten. Für die untersuchten Gene in Reis, deren paraloges Gen in Reis eine Expression des entgegengesetzten elterlichen Allels zeigt (Köhler *et al.*, 2012) könnte ein Wechsel der Imprinting-Regulation innerhalb einer Spezies für einen Ausgleich des parentalen Genomgleichgewichts verantwortlich sein. Die Triploidie des Endosperms von Angiospermen resultiert in einem genomischen Ungleichgewicht zu Gunsten der maternalen regulatorischen Faktoren (Birchler, 1993; Scott *et al.*, 1998; Birchler & Veitia, 2012). Die Identifikation von mehr paternal imprinteten Genen als maternal imprinteten Genen im Maisendosperm könnte ein Hinweis auf einen Ausgleich der Genomdosis sein (Zhang *et al.*, 2011).

Ein Vergleich der Expressionsprofile imprinteter Gene in 60 Maisgeweben aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien resultiert in drei grundsätzlich verschiedenen Expressionstypen in den untersuchten Maisgeweben (Sekhon *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Es wurden Gene mit einer universellen Expression auf einem hohen Level, Gene mit einer bevorzugten Expression im Endosperm und Samen sowie Gene mit einer hohen differenziellen Expression in Wurzel, Blatt und der reproduktiven Entwicklung ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigten mittels RT-PCR analysierte Maisgene eine Endosperm-bevorzugte Expression sowie ein

Diskussion

relativ niedriges Expressionslevel in anderen Geweben (Zhang *et al.*, 2011). Aus Vergleichen der Expressionsprofile von konservierten Genen geht hervor, dass zwischen verschiedenen Spezies konservierte imprintete Gene eine Endosperm-bevorzugte Expression aufweisen (Waters *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der identifizierten imprinteten Gene mittels RT-PCR in Gameten untersucht. Die Expressionsprofile einiger maternal imprinteter Gene zeigten eine Expression im Pollen bzw. konnte für paternal imprintete Gene eine Expression in der Zentralzelle detektiert werden. Diese Ergebnisse in Mais sind im Einklang mit Erkenntnissen aus Expressionsprofilen in *Arabidopsis* und Reis (Luo *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011). Eine Theorie besagt, dass die Transkripte der paternal imprinteten Gene nach der Befruchtung aus der Spermazelle in den Samen übertragen werden (Wolff *et al.*, 2011). Die Ergebnisse weisen jedoch auf eine Stilllegung des entsprechenden parentalen Allels nach der Befruchtung hin. Dies lässt den Schluss zu, dass die für die Stilllegung des Allels benötigten Komponenten nicht in den Gameten, sondern ausschließlich im Endosperm vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass über syntenisch orthologe Gene imprintete Gene zwischen verschiedenen Spezies identifiziert werden können. Es konnten neue Gene mit einer allelspezifischen Genexpression in Mais identifiziert werden, die auf eine konservierte Imprinting-Regulation zwischen Reis und Mais hinweisen. Es wurden ebenfalls Variationen des Imprinting-Status zwischen verschiedenen Genotypen und paralogen Genen gezeigt, die auf eine hohe evolutionäre Dynamik des Imprintings hinweisen.

9.2 Untersuchung eines maternal imprinteten Gens in Maisembryo

Imprinting in Pflanzen wurde bis vor kurzem nur im Embryo ernährenden Endosperm vermutet, welches im Gegensatz zum Embryo keinen genetischen Beitrag zur nächsten Generation leistet. Diese Annahme wurde 2009 im Zuge der Identifikation des ersten imprinteten Gens im Maisembryo widerlegt (Jahnke & Scholten, 2009). Für das Gen *MEE1* konnte im Maisembryo als auch im Endosperm eine maternal imprintete Expression nachgewiesen werden. Zur Identifikation weiterer imprinteter Gene im Maisembryo wurden in der vorliegenden Arbeit 13 putativ imprintete Gene mit Sequenz-Polymorphismen mittels RNA-Tiefensequenzierung identifiziert und deren genaue Expression mittels allelspezifischer Expressionsanalysen überprüft. Im Zuge dieser Analysen konnte für das Gen GRMZM2G014119 eine maternal imprintete Expression im Maisembryo nachgewiesen werden.

Zunächst wurde jedoch, nach der Tiefensequenzierung und der allelspezifischen Expressionsanalyse das Gen GRMZM2G014256 und nicht das Gen GRMZM2G014119 als

Diskussion

imprintet identifiziert. Aufgrund der Länge des amplifizierten Transkripts konnte mittels Datenbankanalyse (MaizeSequence 5b.60, www.maizesequence.org) festgestellt werden, dass nicht das Gen GRMZM2G014256, sondern das Gen GRMZM2G014119 im Maisembryo exprimiert wird. Untersuchungen, ob es sich bei den beiden Genannotationen womöglich um Spleißvarianten ein und desselben Gens handelt, ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Laut der Datenbank Gramene (#36b) (Youens-Clark *et al.*, 2010 // 2011) unterliegt das Gen GRMZM2G014256 keinem alternativen Spleißing, wohingegen in der Datenbank MaizeSequence 5b.60 die beiden Gene als Spleißvarianten dargestellt werden. Beide Datenbanken zeigen für die Gene eine übereinstimmende Position auf Chromosom 6 auf, wobei jedoch GRMZM2G014256 auf dem Vorwärts- und GRMZM2G014119 auf dem Rückwärtsstrang lokalisiert sind. Die Ermittlung der paralogen Gene von GRMZM2G014119 mittels der Datenbanken MaizeSequence und Gramene ergab, dass die beiden Gene in Mais nicht paralog sind. Aufgrund der Tatsache, dass die Gene GRMZM2G014256 und GRMZM2G014119 auf unterschiedlichen DNA-Strängen lokalisiert sind handelt es sich daher nicht um zwei Spleißvarianten eines Gens sondern um zwei unterschiedliche Gene, von denen ausschließlich das Gen GRMZM2G014119 ein maternales Imprinting im Embryo aufweist.

In der allelspezifischen Expressionsanalyse konnte zwischen den reziproken Kreuzungen für das Gen GRMZM2G014119 ein Polymorphismus sowie an 14 Positionen ein Doppelpeak im Chromatogramm detektiert werden. Es wurde vermutet, dass die Doppelpeaks von Transkripten eines oder mehrerer paraloger Gene aus Mais stammen könnten, die ebenfalls mit der RT-PCR amplifiziert wurden. Es konnte ein paraloges Gen (GRMZM2G044440) mit einer Homologie von 91% identifiziert werden. Um die Herkunft der Doppelpeaks zu untersuchen wurden die jeweils an diesen Positionen amplifizierten Nukleotide mit den Nukleotiden der beiden paralogen Gene verglichen. Dabei konnten die erwarteten Nukleotide von beiden Genen identifiziert werden, was zunächst für eine erfolgreiche Amplifikation beider Gene mittels RT-PCR und folglich einer Expression im Maisembryo spricht. Für das paraloge Gen GRMZM2G044440 konnte an der Position des Polymorphismus von GRMZM2G014119 nur für eine Kreuzungsrichtung das erwartete Nukleotid detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass beide Gene an der Position einen Polymorphismus aufweisen und folglich beide mittels einer allelspezifischen Genexpression reguliert werden. Ein Vergleich der Chromatogramme der Inzuchtlinien mit den reziproken Kreuzungen an der Position des Polymorphismus konnte die maternale Imprinting-Regulation des Gens GRMZM2G014119 im Maisembryo bestätigen. Diese maternale Imprinting-Expression des Gens GRMZM2G014119 im Embryo steht im Einklang mit den verfügbaren Daten aus RNA-Tiefensequenzierungen in Maisembryo (Waters *et al.*, 2011).

Diskussion

Eine Hypothese besagt, dass Imprinting in Pflanzen auf den Zeitraum der Embryo- und Endospermentwicklung begrenzt ist (Scholten, 2010). Diese Phase ist im Unterschied zu Säugetieren, die eine Imprinting-Regulation im Embryo und ausgewachsenem Organismus zeigen (Gregg *et al.*, 2010; Bartolomei & Ferguson-Smith, 2011), der einzige Zeitpunkt an dem die elterlichen Allele im Zuge der parentalen Konflikt-Theorie einen Einfluss auf die Entwicklung des Nachkommen nehmen können (Scholten, 2010). Um zu ermitteln, ob die in 6 dap identifizierte allelspezifische Genexpression des Gens GRMZM2G014119 auch in einem späteren embryonalen Entwicklungsstadium vorliegt, wurden die verfügbaren Daten aus aktuellen RNA-Tiefensequenzierungen imprinteter Gene aus Mais herangezogen. Die Suche ergab, dass in 14 dap Embryogewebe ebenfalls eine maternale Genexpression des Gens im Maisembryo nachgewiesen werden konnte (Waters *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse deuten somit auf ein stabiles Imprinting innerhalb dieses Zeitraumes hin. Der Zeitraum des maternalen Imprintings entspricht dem von bereits bekannten embryonalen imprinteten Genen, *MEE1* und *Os10g05750*. Für das maternal imprintete Gen *MEE1* in Mais konnten vor und nach der Expression des Gens zwischen 3-8 dap keine Transkripte im Mais nachgewiesen werden (Jahnke & Scholten, 2009). Um dies für das Gen GRMZM2G014119 im Embryo zu ermitteln, müssten daher weitere Entwicklungsstadien des Embryos untersucht werden. Des Weiteren könnten wie bereits für das Gen *MEE1* in Gameten und Embryo Methylierungsanalysen durchgeführt werden (Jahnke & Scholten, 2009). So könnte, wie bereits für *MEE1* gezeigt, für das Gen GRMZM2G014119 eine Demethylierung des maternalen Allels im Embryo mit einer anschließenden Remethylierung denkbar sein, ein Prozess welcher mit einer zeitlich begrenzten Expression im Embryo einhergeht. Eine transiente imprintete Genexpression wurde ebenso für das in 6 dap Reisembryo maternal imprintete Gen *Os10g05750* ermittelt. Mittels allelspezifischer Expressionsmuster konnte in 8 dap Reisembryo eine Expressionsveränderung in Richtung einer biallelischen Expression des Gens *Os10g05750* gezeigt werden (Luo *et al.*, 2011). Des Weiteren wurden die in aktuellen Studien identifizierten putativ imprinteten Gene in *Arabidopsis*, Reis und Mais zwischen 40 Stunden nach Bestäubung (Nodine & Bartel, 2012) und 14 dap ermittelt (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011). Eine imprintete Genexpression konnte in vegetativen Geweben, wie Reis- und Maiskeimlingen reziproker Kreuzungen nicht gefunden werden, was ebenfalls auf eine transient imprintete Genexpression schließen lässt (He *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Es bleibt zu prüfen, ob für alle identifizierten imprinteten Gene im Embryo ebenfalls eine allelspezifische Genexpression im Endosperm vorliegt und diese stabil ist. Eine in dieser Arbeit durchgeführte allelspezifische Genexpressionsanalyse des Gens GRMZM2G014119 in 6 dap Maisendosperm deutet auf eine Imprinting-Regulation hin. Diese Beobachtung wird gestützt durch Daten aus 10 und 14 dap Maisendosperm, die ebenfalls eine imprintete Expression des Gens GRMZM2G014119 zeigen konnten (Waters *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass

Diskussion

sich der früh entwickelnde Embryo und das Endosperm gemeinsame Imprinting-Regulationen teilen, die ausschließlich in der frühen Samenentwicklung eine essenzielle Funktion ausüben. Eine Hypothese besagt, dass der Embryo und das Endosperm übereinstimmende imprintete Gene aufweisen, um die Nährstoffversorgung nach Bedarf der sich entwickelnden Nachkommen zu regulieren (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2012). Die Imprinting-Regulation könnte sich auf den Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung beschränken, da zu dem Zeitpunkt imprintete Gene noch über eine Kontrolle des Nährstoffangebots verfügen. Diese transiente Kontrolle durch Imprinting könnten Gene ausüben, die in dem ebenfalls transienten bzw. kurzlebigen Suspensor lokalisiert sind (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2012), der eine wichtige Rolle in der Versorgungsfunktion des sich entwickelnden Embryos spielt (Sitte & Strasburger, 2002).

Die Identifizierung des imprinteten Gens GRMZM2G014119 im Embryo entspricht aktuellen Studien, die darauf hindeuten, dass eine allelspezifische Genexpression im Embryo öfter vorkommt, als bisher erwartet wurde. Mittels RNA-Tiefensequenzierungen wurden über 100 putativ imprintete Gene im Embryo von *Arabidopsis*, Reis und Mais ermittelt (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011; Nodine & Bartel, 2012), deren Imprinting-Regulation noch verifiziert werden muss. Bisher wurde lediglich eine Imprinting-Regulation für das maternale Gen *Os10g05750* in Reis mithilfe allelspezifischer Expressionsmuster bestätigt (Luo *et al.*, 2011). Zur Untersuchung, ob in anderen Spezies ebenso eine allelspezifische Genexpression des Gens GRMZM2G014119 vorkommt, wurden die Gen-Daten kürzlich identifizierter imprinteter Gene aus *Arabidopsis* und Reis begutachtet. Das orthologe Reisgen (*LOC_Os06g44080*) konnte mittels RNA-Tiefensequenzierung in 6 ddp Embryo und 5 ddp Endosperm nicht als imprintet identifiziert werden (Luo *et al.*, 2011). Daneben wurde das orthologe Gen in *Arabidopsis* (AT1G31340.1) in zwei unabhängigen Analysen untersucht. Mittels der Genotypkombination Col-0 x Ler konnte kein Imprinting im Embryo und Endosperm detektiert werden, wohingegen bei Verwendung der Genotypen Col-0 x Bur-0 maternales Imprinting im Endosperm für das Gen GRMZM2G014119 gezeigt werden konnte (Hsieh *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2011). Diese Daten deuten auf eine Konservierung der Imprinting-Regulation des Gens GRMZM2G014119 im Endosperm zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen hin. Aufgrund der unterschiedlichen Imprinting-Ergebnisse in *Arabidopsis* bei der Verwendung von verschiedenen Genotypkombinationen ergibt sich wie in Abschnitt 9.1 näher erörtert, für das Gen eine Abhängigkeit des Imprintings vom Genotyp. Eine Untersuchung der allelspezifischen Genexpression im *Arabidopsis*-Embryo der Genotypen Col-0 und Bur-0 könnte Aufschluss darüber geben, ob ebenso eine konservierte Imprinting-Regulation im Embryo vorliegt.

Die Identifikation von paternal imprinteten Genen auf Basis von Expressionsprofilen kann im Gegensatz zu maternal imprinteten Genen eindeutig erfolgen, da eine Kontamination durch

Diskussion

maternale Samengewebe keine Verfälschung des Expressionsprofils zur Folge hat. Aufgrund der möglichen Kontamination von embryonalem Gewebe wurde das Transkriptionslevel in Endosperm und Embryo für das identifizierte maternal imprintete Gen GRMZM2G014119 in Mais untersucht. Mittels der RNA-Tiefensequenzierung konnte eine 58-fach höhere Anzahl der maternalen Transkripte im 6 dap Endosperm als im Embryo detektiert werden. Dieses Ergebnis wird durch ein übereinstimmendes Expressionsprofil des Gens GRMZM2G014119 in 12-25 dap Endosperm und Embryo bestätigt (Davidson *et al.*, 2011; Sekhon *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011). Für die Mehrzahl der kürzlich identifizierten imprinteten Gene im Embryo aus *Arabidopsis*, Reis und Mais konnte ebenfalls eine stärkere Imprinting-Expression im Endosperm nachgewiesen werden (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011). Diese höheren Expressionslevel führten dazu, dass ein Großteil der in den verschiedenen Spezies identifizierten embryonalen Gene als fragliche bzw. falsch positive Imprinting-Regulation im Embryo bezeichnet wurde. Diese Gene wurden infolgedessen als falsch positiv im Embryo verworfen, da eine Kontamination des untersuchten embryonalen Gewebes mit Gewebe des Endosperms nicht ausgeschlossen werden konnte (Gehring *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011). Eine Kontamination des in dieser Arbeit untersuchten embryonalen Gewebes kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da im Gegensatz zu *Arabidopsis* und Reis das Maisendosperm sowie der Maisembryo gut voneinander zu trennen sind. Es wird vermutet, dass eine Transkriptverschiebung imprinteter Gene vom Endosperm zum Embryo stattfindet (Waters *et al.*, 2011). Diese Transkriptverschiebung könnte zur Folge haben, dass eine Imprinting-Regulation für die entsprechenden Gene im Embryo nachgewiesen werden würde, ohne dass eine aktive Expression im Embryo stattgefunden hat (Waters *et al.*, 2011). Diese Hypothese ist jedoch schwer mit der nachgewiesenen transienten Expression des imprinteten Gens *MEE1* vereinbar, da die Expression im Embryo mit einer Demethylierung bzw. einer Remethylierung des maternalen Allels korreliert. Des Weiteren könnten die Transkripte imprinteter Gene aus den Gameten stammen, die die stabilen Transkripte über das Befruchtungseignis dem Nachkommen vererben (Waters *et al.*, 2011).

Zur Identifikation einer putativen Funktion des maternal imprinteten Gens GRMZM2G014119 wurden die möglichen Translationsprodukte des Transkriptes über Sequenzhomologie analysiert. Für das aus 153 Aminosäuren aufgebaute Protein wird eine Pfam-, SMART- und Prints-Domäne vorhergesagt, die alle für ein Ubiquitin bzw. für eine Ubiquitin-Untergruppe codieren. Laut dem Simple Modular Architecture Research Tool (smart.embl-heidelberg.de) ist Ubiquitin ein aus 76-Aminosäuren aufgebautes Protein und ist in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Ubiquitin ist mittels einer kovalenten Bindung an der reversiblen Modifikation von Proteinen beteiligt (Radivojac *et al.*, 2010). Für ungefähr 6% der in *Arabidopsis* vorhergesagten proteincodierenden

Diskussion

Gene wird eine Verbindung mit Ubiquitin vorausgesagt (Bartel & Citovsky, 2012). Für Ubiquitin konnten unter anderen Funktionen beim Proteinabbau, Kontrolle der Insulinregulation, der pflanzlichen Entwicklung insbesondere bei der Regulation der Phytohormone gezeigt werden (Rome *et al.*, 2004; Bartel & Citovsky, 2012). Des Weiteren ist die Ubiquitinylierung in die Histon-Modifikation involviert (Gibney & Nolan, 2010; Hamilton, 2011). Diese Histon-Ubiquitinylierung wird mit transkriptioneller Genaktivierung in Verbindung gebracht (Zhang, 2003). Entsprechend der Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen könnte das imprintete Gen GRMZM2G014119 eine putative Funktion in der epigenetischen Regulation ausüben, die einen Einfluss auf die Samenentwicklung hat. Das imprintete Expressionsverhalten dieses Gens könnte bedeuten, dass die exakte Regulation dieser Funktion essenziell ist, da die Imprinting-Regulation des Gens zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen konserviert ist.

Abschließend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit das Gen GRMZM2G014119 als im Maisembryo imprintet nachgewiesen wurde. Analysen der Genexpression im Endosperm ergaben für die Imprinting-Regulation eine Abhängigkeit von Genotyp. Das in Angiospermen konservierte, imprintete Gen GRMZM2G014119 könnte eine wichtige Funktion zur Regulation in der Samenentwicklung ausüben.

9.3 *DNG105* aus Mais hat eine Rolle in der Imprinting-Regulation

In Pflanzen sind DNA-Glykosylasen über den Basenexzisions DNA-Reparatur-Regulationsweg an der aktiven Demethylierung beteiligt (David *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2008). Die in *Arabidopsis* vorkommende DNA-Demethylase DEMETER (DME) entfernt 5-Methylcytosine in CG, CHG und CHH Sequenzkontexten (Gehring *et al.*, 2006; Morales-Ruiz, 2006). DME ist für das Imprinting im Endosperm ebenso wie für eine normale Samenentwicklung erforderlich (Choi *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2006). DME-ähnliche Proteine (DML) in *Arabidopsis* sind die DNA-Glykosylasen ROS1 (repressor of silencing1), DML2 und DML3 (Zhu, 2009). Laut der Chromatin-Datenbank ChromDB (Gendler *et al.*, 2008) wurden vier DNA-Glykosylasen in Mais identifiziert. Die Proteine DNG101, DNG102, DNG103 und DNG105 aus Mais werden in die ROS/DME Gruppe eingeordnet.

Aufgrund der bekannten Funktionen für *DME* an der Imprinting-Regulation in *Arabidopsis* wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob *DNG105* aus Mais ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des genomischen Imprinting hat. Für die Analysen wurde *DNG105* ausgewählt, da für *DNG105* im Gegensatz zu *DNG101* und *DNG102* eine Expression in der Spermazelle, jedoch nicht in der Ei- und Zentralzelle detektiert werden konnte und folglich keine Genredundanz vorliegt. Für

Diskussion

die DNA-Demethylase *DME* aus *Arabidopsis* konnte eine Expression in der Zentralzelle des weiblichen Gametophyten und im vegetativen Nukleus des Pollens nachgewiesen werden (Choi *et al.*, 2002; Calarco *et al.*, 2012). Zur Charakterisierung der *DNG105* aus Mais wurden mögliche Translationsprodukte des Transkripts über Sequenzhomologie untersucht. Das Protein ist aus 1233 Aminosäuren aufgebaut und besteht laut der Chromatin-Datenbank ChromDB aus einer Pfam-Domäne, die der HhH-GPD Superfamilie der Basenexzisionsreparatur-DNA-Proteine zugeordnet wird (Gendler *et al.*, 2008). *DNG105* verfügt ebenso wie *DME* über eine bifunktionelle 5-Methylcytosin DNA-Glykosylase, sowie eine Endonuklease/Lyase Aktivität (Gehring *et al.*, 2006; Zhu, 2009). Dementsprechend kann *DNG105* N-glykosidische Bindungen lösen und ist mittels der AP-Endonuklease in der Lage Zucker-Phosphat-Bindungen an der Position zu spalten, wo eine Base entfernt werden soll (Gendler *et al.*, 2008; Huh *et al.*, 2008).

Zur Untersuchung einer möglichen Rolle bei der Imprinting-Regulation, wurden vier transgene *dng105*-RNAi Linien in Mais generiert. Im Anschluss wurden die Pflanzen reziprok mit zwei unterschiedlichen Wildtypen gekreuzt und das 6 dap Maisendosperm isoliert. Zur Überprüfung der Suppression des *DNG105* in 6 dap Maisendosperm reziproker RNAi-Kreuzungen wurde eine PCR basierte semiquantitative Expressionsanalyse durchgeführt. Ein Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen den reziproken Kontrollen und den reziproken RNAi-Kreuzungen ergab eine 7-14-fache Differenz im Expressionslevel zwischen den reziproken Kontrollhybriden und den reziproken RNAi-Proben. Demzufolge konnte im Endosperm reziproker RNAi-Kreuzungen die erfolgreiche Expressionsverminderung der *DNG105* nachgewiesen werden. Zum Ausschluss einer unspezifischen Stilllegung der *dng105*-RNAi Sequenz wurde eine semiquantitative Expressionsanalyse durchgeführt und die Expression der *DNG101* und *DNG102* im 6 dap Maisendosperm reziproker *dng105* RNAi-Kreuzungen im Vergleich zur reziproken Kontrollhybride analysiert. Der Vergleich ergab einen schwachen Einfluss auf die *DNG101* und *DNG102* Expression, da für die beiden Glykosylasen eine verminderte Transkriptmenge im Endosperm reziproker *dng105*-RNAi-Kreuzungen detektiert werden konnte. Die RNA-Spezifität der *dng105* RNAi-Sequenz wurde zur Überprüfung mithilfe der BLAST-Funktion der Chromatin-Datenbank ChromDB mit der NCBI nr/nt Nukleotidsequenzdatenbank verglichen. Es wurde eine Homologie zu anderen Genen in Mais mit max. 16 bp ermittelt. Daneben ergab der Vergleich der *dng105* RNAi-Sequenz mit *DNG101* und *DNG102* fünf homologe Sequenzabschnitte mit max. 12 bp zwischen der *dng105* RNAi-Sequenz zu *DNG101*. Eine unspezifische RNAi-vermittelte Suppression auf Basis der Homologie über 12 bp kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei identischer Verteilung der Nukleotide kann die Sequenz rein zufällig 178x im Maisgenom vorkommen. Eine Übereinstimmung über diesen kurzen Sequenzabschnitt würde durch viele Fehlpaarungen, aufgrund der Sequenzunterschiede, nicht zu einer RNAi-

Diskussion

vermittelten Suppression führen. Im Unterschied dazu konnte eine RNAi-vermittelte Suppression in humanen Zellen mittels 16-nt siRNA gezeigt werden (Chu, 2008). Jedoch kann, aufgrund der nachweislich stärker verminderten Transkriptmenge von *DNG105* als von *DNG101* und *DNG102* im Maisendosperm reziproker RNAi-Kreuzungen, in erster Linie von einer Suppression des *DNG105* in Mais ausgegangen werden.

Für die Analysen wurde die Imprinting-Genexpression der maternal imprinteten Gene *MEE1* und *FIE1* sowie der paternal imprinteten Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 mithilfe allelspezifischer Expressionsanalysen untersucht. Für die allelspezifischen Expressionsanalysen wurde das 6 dap Maisendosperm reziproker Kontrollhybride sowie reziproker *dng105* RNAi-Kreuzungen verwendet. Für das maternal imprintete Gen *MEE1* in Mais konnte keine Veränderung gegenüber der ursprünglich beschriebenen Imprinting-Regulation (Jahnke & Scholten, 2009) festgestellt werden. Der Vergleich der Chromatogramme an den Polymorphismen der Kontroll-Hybride mit den reziproken *dng105* RNAi-Kreuzungen ergab eine übereinstimmende maternal imprintete Expression. Diese maternale Imprinting-Regulation für das Gen *MEE1* wurde in allen 15 verwendeten Endospermproben nachgewiesen. Infolgedessen wurde der Nachweis der maternal imprinteten Expression für das Gen *MEE1* als interne Kontrolle verwendet. Im Unterschied zu *MEE1*, wurde für das maternale imprintete Gen *FIE1* in Mais eine Veränderung der Imprinting-Expression festgestellt (Danilevskaya *et al.*, 2003). Die Untersuchung der Polymorphismen ergab für sechs B73 bzw. Mo17 x *dng105* Kreuzungen keine Veränderung der maternal imprinteten Expression des Gens *FIE1*. Während für drei der vier analysierten *dng105* x B73 bzw. Mo17 Kreuzungen ein Einfluss auf das Imprinting detektiert wurde. Abhängig von der verwendeten *dng105* RNAi-Linie oder Endosperm-Probe wurde eine Aktivierung des sonst stillgelegten Allels am Polymorphismus detektiert oder das gleiche Allel in beiden Kreuzungsrichtungen nachgewiesen. Die Unterschiede in den verschiedenen Proben können wahrscheinlich durch unterschiedlich starke RNAi-Effekte, aufgrund von Positionseffekten (Knippers, 2006), erklärt werden. Für das maternale Gen *FIE1* wurde eine Aufhebung des Imprinting oder eine Aktivierung des paternalen Allels nachgewiesen, wenn in der Kreuzung die transgene Maispflanze der weibliche Elter war.

Der Vergleich der Chromatogramme der reziproken Kontroll-Hybride und der reziproken *dng105* RNAi-Kreuzung am Polymorphismus ergab für die Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 eine Veränderung der paternalen Imprinting-Regulation im 6 dap Maisendosperm. Das Gen GRMZM2G472052 wurde nur in einer reziproken *dng105* RNAi-Kreuzung untersucht. Die Chromatogramme zeigten in der Kreuzungsrichtung B73 x *dng105* Doppelpeaks am Polymorphismus und somit eine biallelische Expression des Gens GRMZM2G472052. Für das Gen GRMZM2G091819 konnte in drei unterschiedlichen *dng105*

Diskussion

RNAi-Linien in der Kreuzungsrichtung B73 x *dng105* eine Expression beider parentalen Allele am Polymorphismus nachgewiesen werden oder in beiden Kreuzungsrichtungen wurde das gleiche Allel nachgewiesen. Dementsprechend konnte für die paternal imprinteten Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 eine Aufhebung des Imprinting oder eine Aktivierung des maternalen Allels ermittelt werden, wenn in der Kreuzung die transgene Maispflanze der männliche Elter war.

Die Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 und *DNG105* aus Mais könnten von einem ähnlichen Regulationsmechanismus betroffen sein, wie *MEA* und *DME* in *Arabidopsis*. Die Imprinting-Regulation des maternal imprinteten Gens *MEA* läuft wie folgt ab: In der Spermazelle liegt das nicht exprimierte paternale *MEA* Allel aufgrund einer aktiven Methylierung mittels *MET1* hypermethyliert vor (Gehring *et al.*, 2006; Raissig *et al.*, 2011), während in der Zentralzelle die DNA-Methylierung des *MEA* Locus gezielt entfernt wird. Die Demethylierung erfolgt auf Basis von *DME* welches in der Zentralzelle und der vegetativen Pollenzelle (Schoft *et al.*, 2011), allerdings nicht in der Eizelle und dem Endosperm, exprimiert wird (Choi *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2006). *MEA* ist ein autoregulierendes Gen, da das paternale Allel nach der Befruchtung, mithilfe des *MEA*-enthaltenden PcG-Komplexes FIS-PRC2, einer H3K27 Methylierung unterliegt und folglich im Endosperm nicht exprimiert wird. Daraus resultiert eine monoallelische Expression des maternalen Allels im Endosperm (Kohler, 2003a; Gehring *et al.*, 2006). Außerdem vermittelt der FIS-PRC2-Komplex die Stilllegung des maternalen Allels des paternal imprinteten Gens *PHERES1* (Kohler, 2003b; Köhler *et al.*, 2004).

Die Beeinflussung beider untersuchten paternal exprimierten Gene durch *DNG105* deuten auf einen gemeinsamen Regulationsweg hin. Der Regulationsweg für die Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 in Mais könnte mit Berücksichtigung darauf, dass die Gene im Unterschied zu *MEA* paternal exprimiert sind und *DNG105* in der Spermazelle exprimiert ist, wie in der Abbildung 30 dargestellt folgendermaßen ablaufen: Das Allel der entsprechenden paternalen Gene könnte durch eine DNA-Methylierung in der Zentralzelle stillgelegt werden. Während *DNG105* in der Spermazelle die paternalen Allele der Gene demethyliert und folglich die Expression im Endosperm initiiert. Für *DNG105* konnte ebenfalls eine Expression im Endosperm detektiert werden. Aufgrund dessen könnte das paternale Allel der Gene alternativ erst im Endosperm demethyliert und daraufhin exprimiert werden. Die maternalen Allele der paternal imprinteten Gene könnten im Endosperm mittels eines Komplexes, analog zum FIS-PRC2-Komplex in *Arabidopsis*, durch eine Histon-Methylierung stillgelegt werden. Die Gene könnten GRMZM2G091819 oder GRMZM2G472052 PcG-Komplex betroffene Gene sein. Die Beteiligung der beiden Gene am Komplex selbst erscheint durch die vorhandenen Homologien zu funktionellen Domänen eher unwahrscheinlich.

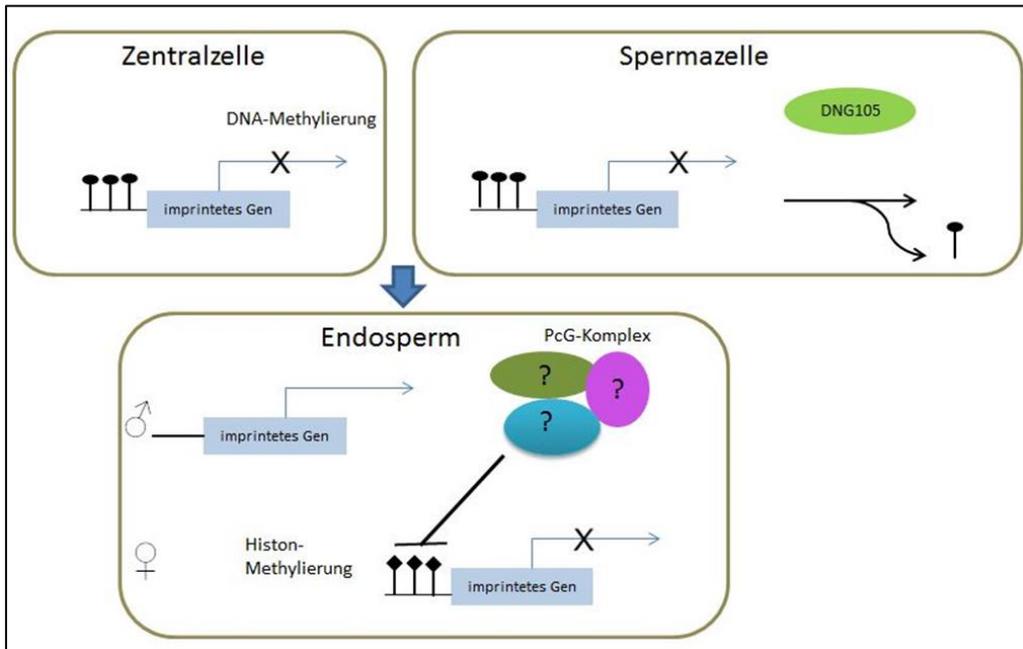


Abbildung 30: Schematischer Reaktionsweg der paternal imprinteten Gene und DNG105 in Mais

Die Darstellung zeigt einen möglichen Imprinting-Regulationsweg für die paternal imprinteten Gene GRMZM2G091819 oder GRMZM2G472052 in Mais.

Die in der vorliegenden Arbeit amplifizierten gleichen Allele am Polymorphismus in beiden Kreuzungsrichtungen bzw. die biallelische Expression in einer Kreuzungsrichtung (WT x *dng105*) für die paternalen Gene GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052, lässt sich über eine unterschiedliche Höhe der Expressionsverminderung der *DNG105* in Mais erklären. Wenn in der Spermazelle bzw. im Endosperm keine vollständige Expressionsverminderung der *DNG105* stattgefunden hat, könnte es zu einer unvollständigen Demethylierung des paternalen Allels von PcG-Komplex Genen führen. Folglich könnten weniger funktionsfähige Komplexe gebildet werden, die das maternale Allel über die Histon-Methylierung stilllegen können. Daraus könnte im Endosperm eine biallelische Expression resultieren. Wohingegen bei einer vollständigen Expressionsverminderung der *DNG105* in der Spermazelle und dem Maisendosperm das paternale Allel keiner Demethylierung unterliegt und somit nicht exprimiert wird. Folglich könnten keine funktionsfähigen Komplexe gebildet werden, die das maternale Allel im Endosperm stilllegen könnten. Demzufolge könnte es im Endosperm zu keiner paternalen aber einer maternalen Expression kommen. Dieser hypothetische Regulationsweg für *DNG105* und einem PcG-Komplex in Mais wird durch den Nachweis, dass nur 17,3% der parentalen Allele imprinteter Gene in Mais eine differentiell methylierte Region aufweisen und somit die Mehrzahl der Gene mittels eines anderen Regulationsmechanismus reguliert werden muss unterstützt (Zhang *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* konnte nachgewiesen werden, dass eine *DME*-vermittelte DNA-Hypomethylierung und der FIS-PRC2-Komplex mittels eines gemeinsamen Regulationsmechanismus das maternale

Diskussion

Allel von paternal imprinteten Genen stilllegt (Wolff *et al.*, 2011; Köhler *et al.*, 2012). In *fie*-Mutanten zeigten alle neun und in *dme*-Mutanten vier von neun untersuchten paternal imprinteten Genen eine Aktivierung des maternalen Allels (Hsieh *et al.*, 2011). Diese biallelische Expression im *Arabidopsis*-Endosperm spricht wie in der vorliegenden Arbeit für eine Stilllegung des maternalen Allels für das PEG im Wildtyp-Endosperm durch den PcG-Komplex. Für das maternale *MEA* in *Arabidopsis* ist das Vorhandensein der DNA-Methylierung am paternalen Allel das charakteristische Merkmal, welches den FIS-PRC2-Komplex zum paternalen *MEA*-Allel im Endosperm leitet (Köhler & Makarevich, 2006). Dementsprechend könnte in Mais ebenso das maternale Allel des PEGs eine DNA-Methylierung zur Rekrutierung des PcG-Komplexes aufweisen. Die für den hypothetischen Regulationsweg vorgeschlagene Histon-Methylierung zur Stilllegung des maternalen Allels wird durch den Nachweis, dass paternal imprintete Genloci doppelt so hohe H3K27me3-Level im Endosperm zeigen, als maternal imprintete Gene unterstützt (Wolff *et al.*, 2011). Eine Analyse der Expressionsprofile der Gene GRMZM2G091819 oder GRMZM2G472052 in Mais ergab, dass das Gen GRMZM2G091819 nicht und das GRMZM2G472052 sehr schwach in der Wildtyp-Spermazelle exprimiert wird. Der Nachweis über eine verminderte Expression der *DNG105* in der Spermazelle der transgenen RNAi-Linie und Methylierungsanalysen, könnten Aufschluss darüber geben, ob *DNG105* in der Spermazelle einen Einfluss auf die DNA-Methylierung der Gene hat.

In den allelspezifischen Expressionsanalysen des maternal imprinteten Gens *FIE1* in Mais wurde eine Aufhebung des Imprinting oder eine Aktivierung des paternalen Allels nachgewiesen, wenn in der Kreuzung die transgene Maispflanze der weibliche Elter war. Diese Veränderung der Imprinting-Regulation wurde nicht in der *dng105* x WT Kreuzungsrichtung erwartet, weil in der vorliegenden Arbeit in der Zentralzelle keine Expression der *DNG105* detektiert wurde. In Mais wurde eine maternale Hypomethylierung von maternal imprinteten Genen beobachtet, was auf ein *DME*-ähnliches Protein in der Mais-Zentralzelle schließen lässt (Zhang *et al.*, 2011). Hier wäre zu prüfen, ob *DNG105* in der frühen Phase der Entwicklung des weiblichen Gametophyten exprimiert wird oder das Expressionslevel so gering ist, dass es in der durchgeführten Expressionsanalyse unter der Nachweisgrenze lag. Aufgrund dessen sollten zur Visualisierung der *DNG105* Expression Analysen mit einem sensitiven Reporter gen wie z.B. GUS durchgeführt werden. Eine Expression der *DNG105* in der frühen Entwicklung des weiblichen Gametophyten und dem Maisendosperm wäre in Übereinstimmung mit der für *FIE1* gezeigten hypomethylierten DMR in der Zentralzelle und dem Endosperm (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006). Im Mais-Wildtyp wird die DNA-Methylierung der DMR in der Zentralzelle entfernt, jedoch konnte keine maternale Expression nachgewiesen werden (Hermon *et al.*, 2007). Im Maisendosperm wurde eine *FIE1* Expression ungefähr 24-32h nach der Befruchtung, sowie eine Demethylierung des paternalen Allels, die

Diskussion

jedoch nicht mit einer Expression des paternalen *FIE1*-Allels einhergeht, dokumentiert (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006; Hermon *et al.*, 2007). Die Aufrechterhaltung der aktiven maternalen Expression im Endosperm erfolgt über H3 und H4 Acetylierung sowie H3K4 Dimethylierung (Haun & Springer, 2008). Im Gegensatz dazu bewirkt die DNA-Methylierung und H3K27 Di- und Trimethylierung die Repression des paternalen Allels (Haun & Springer, 2008). Demzufolge würde es aufgrund der Expressionsverminderung der *DNG105* in Mais zu einer verminderten bzw. keiner Demethylierung in der Zentralzelle und dem Endosperm kommen. Daraus könnte eine reduzierte Expression des maternalen Allels resultieren. *FIE1* könnte in Mais ebenfalls eine Untereinheit eines PcG-Komplexes sein, da das Gen ein Homolog der PcG-Untereinheit *FIE* aus *Arabidopsis* ist (Springer 2002). In dem Fall könnte die verminderte Demethylierung des maternalen Allels im Endosperm zu einer reduzierten Menge an funktionsfähigen PcG-Komplexen geführt haben, was eine mögliche Veränderung der Autoregulation des maternal imprinteten Gens *FIE1* in Mais zur Folge haben kann. Ergebnisse aus *Arabidopsis* stützen die Hypothese einer Imprinting-Regulation von MEGs über einen PcG-Komplex. Mutationen in einer Untereinheit des FIS-PRC2-Komplexes führten zur Aktivierung des in Wildtypen stillgelegten paternalen Allels (Wolff *et al.*, 2011). Außerdem wurde eine biallelische Expression aufgrund einer Mutation in der *DME* in *Arabidopsis* bei maternal imprinteten Genen nachgewiesen (Gehring *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2011).

Die Untersuchungen zeigten, dass *DNG105* für die Demethylierung mehrere Gene in Mais zuständig sein könnte. *DME* in *Arabidopsis* wird für die Aktivierung der Gene *MEA*, *FIS2* und *FWA* benötigt, somit ist die Funktion der Demethylierung in der Regulation unterschiedlicher Gene involviert (Kinoshita *et al.*, 2004; Jullien, 2006). Eine Begutachtung der transgenen *dng105*-Maislinien zeigte keine phänotypische Veränderung der Pflanze bzw. der beiden Befruchtungsprodukte. Möglicherweise haben die untersuchten Gene keine essentielle Funktion in der Entwicklung oder die Funktion wurde mittels eines anderen Gens in Mais kompensiert, da Mutation in den Genen *FIE*, *MSII*, *FIS2* und *MEA* aus *Arabidopsis*, die für ein FIS-PRC2-Protein codieren zur Überproliferation des Endosperms, embryonalen Abort oder Samen-Letalität führen (Köhler & Grossniklaus, 2002; Hennig & Derkacheva, 2009). Ein Samenabort wurden ebenfalls in *dme*-Mutanten in *Arabidopsis* nachgewiesen, die aufgrund der Mutation keine *MEA* Expression zeigte (Xiao *et al.*, 2003).

Für das maternal imprintete Gen *MEE1* in Mais konnte im Unterschied zu den Genen *FIE1*, GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052 in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der allelspezifischen Genexpression aufgrund der Expressionsverminderung der *DNG105* ermittelt werden. Das deutet auf verschiedene Regulationsmechanismen der imprinteten Gene hin. Ein Vergleich der Methylierung von *MEE1* und *FIE1* zeigt, dass *FIE1* im Unterschied zu *MEE1* eine

fast vollständig demethylierte DMR in der Zentralzelle und im paternalen Allel im Endosperm aufweist (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006; Jahnke & Scholten, 2009).

Diese Studie konnte die erste DNA-Glykosylase (*DNG105*) in Mais mit einer Rolle in der Imprinting-Regulation von maternal und paternal imprinteten Genen zeigen. Die Ergebnisse lassen eine indirekte Beteiligung von *DNG105* an der Imprinting-Regulation über PcG-Komplexe bestimmter Gene in Mais vermuten.

9.4 Die Imprinting-Regulation des Gens *MEE1* ist vom genomischen Kontext abhängig

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Imprinting-Regulation von *MEE1* vom genomischen Kontext wurde das Gen *MEE1* und sein Promotor in einen anderen genomischen Kontext überführt, um zu untersuchen, ob das Gen weiterhin über Imprinting reguliert wird. Hierzu wurden transgene *mee1:GFP* Maispflanzen generiert, deren Expression des Fusionsproteins mithilfe des endogenen *MEE1*-Promotors reguliert wurde. Für das *mee1_{pro}:mee1:GFP*-Konstrukt konnte eine erfolgreiche Integration in das Maisgenom und eine Expression nachgewiesen werden. Jedoch wurde keine GFP-Fluoreszenz im Endosperm detektiert. Mittels einer Sequenzierung des *mee1_{pro}:mee1:GFP*-Konstrukts wurde die Sequenz überprüft, aufgrund dessen kann eine mögliche Verschiebung des Leserasters ausgeschlossen werden. Möglicherweise führte die charakteristische 6-fache Serin-Abfolge im *MEE1*-Protein zu einer Konformationsänderung des GFP-Proteins. Da die Funktion des Proteins direkt von seiner drei-dimensionalen Struktur abhängt (Berg *et al.*, 2002), und Serin eine Aminosäure mit geladenen Seitenketten ist (Alberts, 2011), die versuchen sich nahe an der Außenfläche eines Proteinmoleküls anzulagern, wo die Aminosäure Wasserstoffbindungen mit Wasser und anderen polaren Molekülen ausbilden kann (Alberts, 2011). Somit könnte eine Konformationsänderung zu einer funktionellen Störung des GFP-Proteins im Maisendosperm geführt haben.

Zur Analyse der Imprinting-Genexpression wurde das Endosperm reziprok gekreuzter *mee1_{pro}:mee1:GFP* Maispflanzen untersucht. In allen analysierten Endospermproben konnte eine *MEE1*- und *GFP*-Expression nachgewiesen werden. Aufgrund der detektierten Expression in der Kreuzung, in der die transgenen Maislinien den männlichen Elter darstellten, kann gefolgert werden, dass das Gen *mee1_{pro}:mee1:GFP* nicht mittels Imprinting reguliert wurde. Folglich reicht die verwendete Sequenz des Gens und seines Promotors nicht aus, um eine ausschließlich maternale Expression hervorzurufen. Im Unterschied dazu konnte in reziproken Kreuzungen mit FIE1-GUS und FIE2-GFP Fusionsproteinen, bestehend aus dem Promotor und stromabwärts

Diskussion

liegenden Elementen, eine Imprinting-Regulation im Maisendosperm gezeigt werden (Gutiérrez-Marcos *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse, wie auch die Analysen in Abschnitt 8.2 / 9.3, deuten somit auf unterschiedliche Mechanismen in der Imprinting-Regulation der maternal imprinteten Gene *MEE1* und *FIE1* in Mais hin. Für eine effiziente Stilllegung des paternalen Allels des Gens *MEE1* könnten Wechselwirkungen mit entfernten liegenden genomischen Sequenzabschnitten notwendig sein. Eine Abhängigkeit der Imprinting-Regulation von solchen Wechselwirkungen konnte bereits für das paternal imprintete Gen *PHE1* in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Makarevich *et al.*, 2008; Villar *et al.*, 2009). Die Stilllegung des maternalen *PHE1*-Allels ist abhängig von einer hypomethylierten repetitiven Sequenz am 3`Ende des *PHE1* Locus, sowie einer Bindung des FIS PRC2-Komplexes an der *PHE1* Promotor-Region (Makarevich *et al.*, 2008; Villar *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte eine entfernt lokalisierte Sequenz zur epigenetischen Stilllegung über PcG-Bindestellen in *Drosophila* ermittelt werden (Lanzuolo *et al.*, 2007).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Regulation der imprinteten Expression von *MEE1* vom genomischen Kontext abhängig ist.

9.5 Die Remethylierung des maternalen *MEE1*-Allels im Embryo erfolgt über einen schnellen Mechanismus.

Als erstes imprintetes Gen im Maisembryo und Endosperm wurde das Gen *MEE1* nachgewiesen (Jahnke & Scholten, 2009). Im Unterschied zum Maisendosperm konnte für das Gen *MEE1* im Embryo ein Mechanismus gezeigt werden, der die elternspezifischen epigenetischen Prägungen zurücksetzt (Jahnke & Scholten, 2009). Dieser Mechanismus ähnelt dem aus Säugetieren, wo in den primordialen Geschlechtszellen die Methylierung gelöscht und im Anschluss wieder remethyliert wird (Reik *et al.*, 2001; Reik & Walter, 2001; Sha, 2008; Graw & Hennig, 2010). Für das maternal imprintete Gen *MEE1* stehen Methylierungsanalysen in Gameten, Embryo und im Endosperm zur Verfügung (Abbildung 31) (Jahnke & Scholten, 2009). Entsprechend der maternalen *MEE1* Expression, verbleibt das paternale Allel in Spermazellen und beiden Befruchtungprodukten in einem methylierten, stillgelegten Zustand (Jahnke & Scholten, 2009). In der Eizelle wurde ebenfalls eine hypermethylierte DMR nachgewiesen, wohingegen in der Zentralzelle ein geringer Anteil an demethylierten Sequenzen und dementsprechend eine schwache Expression detektiert werden konnte. Nach der Befruchtung erfolgt eine aktive DNA-Demethylierung der maternalen Allele im Endosperm und Embryo. Im Endosperm wird der hypomethylierte Zustand der maternalen DMR aufrecht erhalten, wohingegen die *MEE1* DMR des maternalen Allels in der Zygote eine Demethylierung und eine anschließende Remethylierung während der embryonalen Entwicklung durchläuft. Im Embryo konnte zwischen 3 und 8 dap eine

Diskussion

Expression nachgewiesen werden. Somit korreliert die maternale Expression mit dem demethylierten Zustand des maternalen Allels in beiden Befruchtungsprodukten (Jahnke & Scholten, 2009).

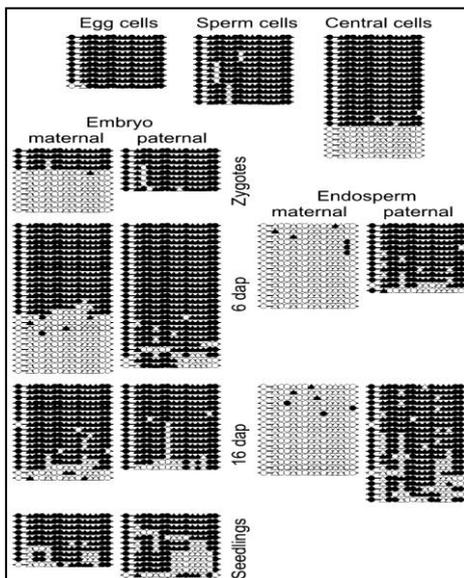


Abbildung 31: Methylierungsprofile von *MEE1* in Gameten, Embryo, Endosperm und Keimling

Die Sequenzen zeigen den Methylierungsstatus der DMR (+221 bis +412) des maternal imprinteten Gens *MEE1* in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. Jede Sequenz repräsentiert einen individuellen Klon. Ausgefüllte Symbole entsprechen einem methylierten bzw. weiße Symbole einen nicht methylierten Sequenzkontext. Die Abbildung wurde aus Jahnke *et al.* entnommen (Jahnke & Scholten, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Dynamik der DNA-Methylierung des Gens *MEE1* die hemimethylierten Cytosine ermittelt, die eine Aussage über die Geschwindigkeit der Remethylierung nach der Replikation erlauben. Hierzu wurde eine *Hairpin*-Bisulfit-PCR in Maisendosperm und Embryo etabliert, mittels der komplementäre DNA-Stränge untersucht werden konnten. Es wurde eine 175 bp lange Sequenz untersucht, die sich relativ zum Transkriptionsstart von *MEE1* an Position +237 bis +412 befindet, was einen Sequenzabschnitt der DMR des Gens *MEE1* entspricht (Jahnke & Scholten, 2009). Für die Analysen wurden 35 maternale und 5 paternale individuelle Klone aus 6 dap Endosperm bzw. 13 maternale und 14 paternale Klone aus dem 7 dap Embryo untersucht. In den komplementären Strängen konnten 8 CG-, 7 CHG- und 23 CHH-Kontexte auf dem Plus-Strang sowie 34 CHH-Kontexte auf dem Minus-Strang analysiert werden. Ein Vergleich der ermittelten prozentualen Durchschnittswerte der Methylierung in den verschiedenen Sequenzkontexten ergab für den maternalen Plus- und Minus-Strang im Endosperm eine fast vollständig demethylierte Sequenz in allen Kontexten (1,1-4,7%). Im Unterschied dazu wurde für den paternalen Plus- und Minus-Strang im Endosperm eine hohe Methylierungsrate im CG- und CHG-Kontext (88,6-94,3%) ermittelt. Diese detektierten Methylierungszustände für das

Diskussion

maternale und paternale Allel aus dem Endosperm sind in Übereinstimmung mit der bekannten maternalen allelspezifischen Genexpression des Gens *MEE1* im 6 dap Maisendosperm (Jahnke & Scholten, 2009). Die embryonalen CG- und CHG-Kontexte des paternalen Plus- und Minus-Strangs zeigen wie die Sequenzkontexte im Endosperm eine fast vollständige Methylierung (85,7-96,4%). Die Analyse ergab für die maternalen Plus- und Minus-Stränge im Embryo Durchschnittswerte der Methylierung von 60,6-68,1% für die CG- und CHG-Kontexte und für die CHH-Kontexte 12,2-14,1%. Jedoch wiesen mehrere untersuchte maternale Klone eine fast vollständige Demethylierung in allen Sequenzkontexten auf. Die Amplifikation von fast vollständig methylierten und demethylierten Sequenzen im 7 dap Embryo entspricht den gezeigten Methylierungsprofilen sowie der maternalen allelspezifischen Expression im 6 dap Maisembryo (Jahnke & Scholten, 2009). Im Vergleich zu den maternalen Strängen aus dem Endosperm wiesen die paternalen DNA-Stränge aus dem Endosperm und alle aus dem Embryo amplifizierten Sequenzen höhere Methylierungsraten im CHH-Kontext auf (13,7-22,7%). Die Methylierungsanalysen zusammenfassend, konnte für das paternale Allel im Endosperm und Embryo eine methylierte Sequenz detektiert werden. Wohingegen das maternale Allel im Endosperm demethyliert war, während im Embryo vollständig demethylierte und methylierte Sequenzen nachgewiesen werden konnten. Ein t-Test konnte zeigen, dass sich die parentalen Sequenzen im Endosperm signifikant voneinander unterscheiden. Das konnte ebenso für mehr als die Hälfte der embryonalen parentalen Sequenzen ermittelt werden, was in Übereinstimmung mit den detektierten demethylierten und methylierten maternalen Sequenzen aus dem Embryo ist. Aufgrund der bekannten Methylierungsprofile für *MEE1* (Jahnke & Scholten, 2009) wurden methylierte paternale und demethylierte maternale Sequenzen im Endosperm erwartet, was sich am Ende bewahrheitet hat. Dadurch konnte die Methode bzw. die Konvertierung der Cytosine bestätigt werden. Ein Vergleich der ermittelten prozentualen Methylierungsraten der komplementären Stränge mit den veröffentlichten Methylierungsanalysen des Plus-Strangs aus 6 dap Maisendosperm und Embryo (Jahnke & Scholten, 2009), ergab für den übereinstimmenden Sequenzabschnitt im Endosperm und Embryo für den CG-Kontext nahezu identische und für den CHG-Kontext leicht erhöhte Methylierungsraten. Im Vergleich zu den veröffentlichten CHH-Daten im Endosperm und Embryo (Jahnke & Scholten, 2009) wurden hier in den komplementären Strängen bis zu 8-fach höhere Methylierungsraten in den CHH-Kontexten detektiert. Möglicherweise wurden CG- und CHG-Kontexte benachbarte Cytosine aufgrund des vorangegangenen Methylierungsereignisses, insbesondere bei der Remethylierung des maternalen Allels im Embryo, durch DNA-Methyltransferasen mit methyliert. Ein Hinweis auf diese Nebeneffekte der Methylierungsaktivität sind vermehrt methylierte CHH-Kontexte in der Nähe von CG- und CHG-Kontexten oder methylierte CHH „Cluster“.

Diskussion

Zur Ermittlung der Dynamik der DNA-Methylierung wurde die prozentuale Hemimethylierung für die überwiegend methylierten, paternalen Sequenzen aus Endosperm und Embryo sowie für die maternalen Sequenzen aus Embryo analysiert. Für die paternalen Sequenzen aus Endosperm und Embryo konnten im CG- und CHG-Kontext im Vergleich zu den maternalen Sequenzen aus dem Embryo bis zu 4 Mal so hohe Hemimethylierungsraten nachgewiesen werden. Untersuchungen in Proben aus z.B. humanen Fibroblasten, Ovarialkarzinomen und Spermien weisen eine prozentuale Hemimethylierung von 4,8-12,1% auf (Laird *et al.*, 2004; Burden *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012), was der Hemimethylierungsrate der maternalen *MEE1*-Sequenzen aus dem Embryo entspricht. Hohe Hemimethylierungsraten, wie in der vorliegenden Arbeit für die paternalen *MEE1*-Sequenzen aus Endosperm und Embryo nachgewiesen, konnten ebenfalls in humanen Leukozyten (20,8%) ermittelt werden (Burden *et al.*, 2005). Außerdem wurden hochsignifikante Methylierungsunterschiede zwischen dem Plus- und Minus-Strang (81,0% zu 17,0%) in *Arabidopsis*-Centromeren gezeigt (Luo, 2003), was auf eine geringe Dynamik der DNA-Methylierung in diesen Bereichen des Genoms schließen lässt. Die Unterschiede in der Hemimethylierungsrate der analysierten maternalen und paternalen *MEE1*-Sequenzen könnten auf verschiedene Mechanismen zur Methylierung der neu synthetisierten DNA-Stränge hindeuten. Die methylierten paternalen Sequenzen könnten mittels einer Methyltransferase methyliert werden, die entsprechend der MET1 aus *Arabidopsis*, für die Aufrechterhaltung der Methylierung zuständig ist (Kankel *et al.*, 2003; Zhu, 2009). Während für die demethylierten maternalen Sequenzen aus dem Embryo eine *de novo* Methyltransferase benötigt wird. Aufgrund der geringen prozentualen Hemimethylierung in den maternalen Sequenzen aus dem Maisembryo könnte hier ein schneller Mechanismus zur Methylierung der Sequenzkontexte vorliegen. Dieser Mechanismus könnte eine vollständige Remethylierung der Sequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung sicherstellen. Die gezielte Remethylierung des maternalen Allels im Embryo könnte über siRNAs vermittelt werden. Dies wurde bereits für die RdDM in *Arabidopsis* gezeigt, bei dem siRNAs die *de novo* Methyltransferase DRM2 an komplementäre Sequenzen leiten, und eine Cytosin-Methylierung bewirken (Wassenegger *et al.*, 1994; Waterhouse & Helliwell, 2003; Xie *et al.*, 2004; Zaratiegui *et al.*, 2007; Wierzbicki *et al.*, 2008; Law & Jacobsen, 2010; He *et al.*, 2011).

In dieser Studie konnten für die maternalen und paternalen Allele des imprinteten Gens *MEE1* in Mais Unterschiede in der Dynamik bei der Remethylierung nach der Replikation gezeigt werden. Die schnelle Remethylierung der maternalen Allele im Embryo deutet auf eine siRNA-vermittelte DNA-Methylierung hin.

9.6 Funktioneller Vergleich von *MEE1* und orthologer Gene in *Arabidopsis*

Für das maternal imprintete Gen *MEE1* wird in Mais eine Funktion in der frühen Kornentwicklung vermutet. Diese Hypothese wird durch den Nachweis von kollabierten *mee1*-RNAi Maiskörnern, mit einer verminderten Proteinmenge in den Befruchtungsprodukten, unterstützt (Mittelberger, 2010). Für eine weitere Bestätigung, dass der Funktionsverlust des Gens *MEE1* zu einer Entwicklungsstörung bzw. zum Abort des Samens führt, wurden homologe *MEE1* Gene in *Arabidopsis* ausgeschaltet. Für die Untersuchung wurden Doppel-Knock-out-Samen erzeugt und mikroskopisch analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Samenentwicklung zwischen den Samen der Doppelmutanten und dem Wildtyp nachgewiesen werden. Aufgrund der Insertionen im Promotor und im Exon der Gene hätten die Mutationen einen vollständigen Verlust der Funktion zur Folge haben müssen. Eine Kompensation der Genfunktion sollte ausgeschlossen sein, da die zwei bekannten paralogen Gene aus *Arabidopsis* für die Erzeugung der Doppelmutanten verwendet wurden. Hier wäre nur eine Kompensation der Funktion über ein Gen in *Arabidopsis* möglich, welches noch nicht als homologes Gen zu *MEE1* aus Mais identifiziert wurde. Ein Vergleich der Proteinsequenzen des Gens *MEE1* aus Mais mit den Proteinsequenzen der beiden orthologen Gene aus *Arabidopsis* ergab, dass die Gene aus *Arabidopsis* zu vergleichbar großen Proteinen von max. 122 Aminosäuren translatiert werden, jedoch zeigen die Proteine nicht die charakteristische 6-fache Serin Abfolge des Gens *MEE1*. Laut der Datenbank TAIR (Lamesch *et al.*, 2011) wird für das Gen AT3G11600 eine Involvierung in die Karrikin-Antwort vorhergesagt. Karrikin ist ein Regulator der in das Pflanzenwachstum involviert ist (Chiwocha *et al.*, 2009). Des Weiteren ist Karrikin in der Lage die Samenruhe zu unterbrechen und wurde bei verbranntem Pflanzenmaterial nachgewiesen (Chiwocha *et al.*, 2009). Demzufolge könnten die orthologen Gene in *Arabidopsis* eine andere bzw. nicht essenzielle Funktion in der Samenentwicklung haben, wie das Gen *MEE1* aus Mais.

Für eine weitere funktionelle Analyse des Gens *MEE1* wurden zur Untersuchung der Auswirkung einer Überexpression des Gens auf die Pflanzen- bzw. Samenentwicklung transgene Überexpressionslinien in Mais generiert, deren Expression des Gens *MEE1* mittels des konstitutiven 35S-Promoters reguliert wurde. Die erfolgreiche Integration des 35S:hsp70:*mee1*:GFP Konstrukts in die Maispflanzen konnte nachgewiesen werden. Bei der Analyse der GFP-Expression konnte nur in den Regeneraten eine schwache und in den Pflanzen der F1-Generation keine GFP-Expression amplifiziert werden. Des Weiteren konnte keine GFP-Fluoreszenz im Blattmaterial und jungen Wurzelspitzen der F1-Generation detektiert werden. Somit wurde ein Expressionsverlust des Gens 35S:hsp70:*mee1*:GFP nach einer Generation festgestellt. Das könnte auf einen Funktionsverlust des konstitutiven Promotors hindeuten. In *Gentiana L.* (Enzian) wurde gezeigt, dass eine *de novo* DNA-Methylierung in der transgenen 35S-

Diskussion

Promotorregion, die ausschließlich nach der Integration des Transgens in das Genom auftrat, eine transkriptionelle Stilllegung der zu untersuchenden Gene bewirkte (Mishiba *et al.*, 2005; Mishiba *et al.*, 2010; Yamasaki *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde in Blattgewebe von Tabak eine 77%ige Erhöhung der 35S-Promotor Methylierung nach 45 Tagen nachgewiesen, was mit einer hohen Expressionsverminderung einherging (Weinhold *et al.*, 2013). Die Methylierung des 35S-Promoters könnte durch die DMR des *MEE1* Gens begünstigt oder ausgelöst worden sein. Klarheit über die Ursache für die Stilllegung des Transgens könnten Bisulfidsequenzierungen des Promoters erbringen. Alternativ könnte mittels einer Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine überprüft werden, ob Methylierung an der Stilllegung beteiligt ist, da 5-Aza-2'-Deoxycytidine die *de novo* Methylierung am 35S-Promotor verhindern würde.

Die funktionellen Analysen des Gens *MEE1* in Mais ergaben, dass die orthologen *MEE1* Gene in *Arabidopsis* möglicherweise eine andere Funktion als *MEE1* in Mais ausüben. Für den zur funktionellen Analyse in transgenen Mais verwendeten konstitutiven 35S-Promotor wird vermutet, dass dieser über eine *de novo* Methylierung stillgelegt wurde.

10 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden imprintete Gene in Mais identifiziert und deren Konservierung in Angiospermen untersucht. Des Weiteren wurden Analysen zur Rolle bei Imprinting einer DNA-Glykosylase in Mais sowie Untersuchungen zur Regulation und Funktion des imprinteten Gens *MEE1* durchgeführt.

Zur Untersuchung der Regulation der Expression des imprinteten Gens *MEE1*, wurden transgene *mee1* Maispflanzen generiert, deren Expression des MEE1-GFP-Fusionsproteins mithilfe des endogenen *MEE1*-Promotors reguliert wurde. Eine Analyse der *mee1*_{pro}:*mee1*:GFP Genexpression in reziproken Maiskreuzungen konnte zeigen, dass das Gen im Endosperm nicht über Imprinting reguliert wurde und folglich der verwendete genomische Kontext des Gens *MEE1* nicht für eine maternale Genexpression ausreichte. Zur *MEE1* Imprinting-Regulation könnten daher wie auch beim *PHE1*, Wechselwirkungen mit weiter entfernt liegenden genomischen Sequenzabschnitten notwendig sein.

Die Dynamik der Remethylierung im Anschluss an die DNA-Replikation wurde für das imprintete Gens *MEE1* in Endosperm und Embryo mittels einer *Hairpin*-Bisulfit-PCR untersucht. Durch Begutachtung der Methylierung der verschiedenen Cytosin-Kontexte in komplementären DNA-Strängen konnte für die paternalen Allele in Endosperm und Embryo eine höhere Hemimethylierungsrate als für die maternalen Allele im Embryo detektiert werden. Die geringere Dynamik der DNA-Methylierung der maternalen Allele im Maisembryo deutet auf eine siRNA-vermittelte DNA-Methylierung hin.

In weiteren Versuchen wurde zur funktionellen Analyse des Gens *MEE1* eine Überexpressionslinie in Mais und eine Insertions-Doppelmutante in *Arabidopsis* generiert. Für die transgene Überexpressionslinie in Mais wurde ein Expressionsverlust nach einer Generation festgestellt sowie keine GFP-Fluoreszenz detektiert. Eine *de novo* DNA-Methylierung am Promotor könnte zum Expressionsverlust des Konstrukts in Mais geführt haben. Für die Doppelmutanten in *Arabidopsis* konnten mittels mikroskopischer Analyse keine Hinweise auf eine Entwicklungsstörung des Samens aufgrund des Funktionsverlusts der orthologen *MEE1* Gene nachgewiesen werden. Der fehlende Einfluss auf die Samenentwicklung könnte auf einer Kompensation der Genfunktion durch noch nicht bekannte paraloge Gene beruhen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen ergab, dass die Gene in Mais und *Arabidopsis* unterschiedliche Funktionen haben könnten.

Zusammenfassung

Die Identifikation putativ, imprinteter Gene in Mais erfolgte über die Identifizierung syntenisch orthologer Gene aus Reis mit einer Imprinting-Regulation. Eine Imprinting-Regulation konnte für 10 orthologe Maisgene mittels allelspezifischer Expressionsanalysen in reziproken Kreuzungen bestätigt werden. Ein Vergleich der Gene mit Datensätzen aus verschiedenen Spezies ergab für mehrere Gene eine konservierte Imprinting-Regulation in monokotylen- und dikotylen-Pflanzen. Die Ergebnisse deuten auf eine höhere Anzahl konservierter, imprinteter Gene als bisher gezeigt hin. Mittels eines Expressionsatlas konnten in Mais drei grundsätzlich verschiedene Expressionstypen für die imprinteten Gene ermittelt werden. Detektierte Variationen des Imprinting-Status zwischen verschiedenen Genotypen und ein Wechsel der Expression von einem elterlichen Allel zum Anderen in verschiedenen Spezies deuten auf eine hohe evolutionäre Dynamik des Imprintings hin.

Auf Basis einer RNA-Tiefensequenzierung wurden putativ imprintete Gene im Maisendosperm nachgewiesen. Mittels Untersuchungen zur allelspezifischen Expression der ausgewählten Gene konnte ein maternal imprintetes Gen im Embryo ermittelt werden. Es wurden erste Hinweise auf eine transiente Genexpression gezeigt, die in Übereinstimmung mit denen bekannter imprinteter Gene im Embryo ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass für das im Embryo imprintete Gen eine konservierte Imprinting-Regulation zwischen Mais und *Arabidopsis* vorliegt. Aufgrund dessen könnte das Ubiquitin codierende Gen eine wichtige Funktion zur Regulation in der Samenentwicklung ausüben.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein Einfluss einer DNA-Glykosylase (*DNG105*) auf die Imprinting-Regulation in Mais gezeigt werden. Hierzu wurden transgene *DNG105* RNAi-Maispflanzen verwendet. Für das Gen *MEE1* konnte keine Veränderung der Imprinting-Regulation in reziproken Kreuzungen nachgewiesen werden. Hingegen konnte für das maternale Gen *FIE1* und in zwei paternal imprinteten Genen eine Aktivierung des sonst stillgelegten Allels detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen eine indirekte Beteiligung von *DNG105* an der Imprinting-Regulation über PcG-Komplexe bestimmter Gene in Mais vermuten.

11 Literaturverzeichnis

- ABROUK M., MURAT F., PONT C., MESSING J., JACKSON S., FARAUT T., TANNIER E., PLOMION C., COOKE R., FEUILLET C. & SALSE J. 2010: Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. *Trends Plant Sci.* 15(9): 479–487.
- ALBERTS B. 2011: *Molekularbiologie der Zelle*. 5th edn. Wiley-VCH, Weinheim, LXII, 1801 S.
- BARLOW D. 1993: Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 260(5106): 309–310.
- BAROUX C., SPILLANE C. & GROSSNIKLAUS U. 2002: Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. *Genome Biol* 3(9): reviews1026.1.
- BARTEE L. 2001: Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & Development* 15(14): 1753–1758.
- BARTEL B. & CITOVSKY V. 2012: Focus on ubiquitin in plant biology. *Plant Physiol.* 160(1): 1.
- BARTOLOMEI M.S. & FERGUSON-SMITH A.C. 2011: Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7).
- BAUER M.J. & FISCHER R.L. 2011: Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(2): 162–167.
- BAULCOMBE D. 2004: RNA silencing in plants. *Nature* 431(7006): 356–363.
- BERG J.M., TYMOCZKO J.L. & STRYER L. 2002: *Biochemistry*. 5th edn. W.H. Freeman, New York.
- BERGER F. 1999: Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2(1): 28–32.
- BIRCHLER J.A. 1993: Dosage analysis of maize endosperm development. *Annu. Rev. Genet.* 27: 181–204.
- BIRCHLER J.A. & VEITIA R.A. 2012: Inaugural Article: Gene balance hypothesis: Connecting issues of dosage sensitivity across biological disciplines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(37): 14746–14753.
- BRETTSCHEIDER R., BECKER D. & LÖRZ H. 1997: Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theoretical and Applied Genetics* (94) Issue 6-7, pp 737-748.
- BRIDEAU C.M., EILERTSON K.E., HAGARMAN J.A., BUSTAMANTE C.D. & SOLOWAY P.D. 2010: Successful Computational Prediction of Novel Imprinted Genes from Epigenomic Features. *Molecular and Cellular Biology* 30(13): 3357–3370.
- BURDEN A.F., MANLEY N.C., CLARK A.D., GARTLER S.M., LAIRD C.D. & HANSEN R.S. 2005: Hemimethylation and non-CpG methylation levels in a promoter region of human LINE-1 (L1) repeated elements. *J. Biol. Chem.* 280(15): 14413–14419.
- CALARCO J.P., BORGES F., DONOGHUE M.T.A., VAN EX F., JULLIEN P.E., LOPES T., GARDNER R., BERGER F., FEIJÓ J.A., BECKER J.D. & MARTIENSSEN R.A. 2012: Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151(1): 194–205.
- CAMPBELL N.A., REECE J.B. & MARKL J. 2003: *Biologie*. 6th edn. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, XLVI, 1606 S.
- CAO X. & JACOBSEN S.E. 2002: Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* 12(13): 1138–1144.
- CARTHEW R.W. & SONTHEIMER E.J. 2009: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4): 642–655.
- CHAN S.W.-L. 2004: RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science* 303(5662): 1336.
- CHAWLA H.S. (2002): *Introduction to plant biotechnology*. 2nd edn. Science Publishers, Enfield, N.H, xxiv, 538.
- CHEUNG P. 2004: Epigenetic Regulation by Histone Methylation and Histone Variants. *Molecular Endocrinology* 19(3): 563–573.
- CHIWOCHA S.D., DIXON K.W., FLEMATTI G.R., GHISALBERTI E.L., MERRITT D.J., NELSON D.C., RISEBOROUGH J.-A.M., SMITH S.M. & STEVENS J.C. 2009: Karrikins: A new family of plant growth regulators in smoke. *Plant Science* 177(4): 252–256.

Literaturverzeichnis

- CHOI Y., GEHRING M., JOHNSON L., HANNON M., HARADA J.J., GOLDBERG R.B., JACOBSEN S.E. & FISCHER R.L. 2002: DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell* 110(1): 33–42.
- DALAKOURAS A. & WASSENEGGER M. 2013: Revisiting RNA-directed DNA methylation. *RNA Biol* 10(3).
- DANILEVSKAYA O.N., HERMON P., HANTKE S., MUSZYNSKI M.G., KOLLIPARA K. & ANANIEV E.V. 2003: Duplicated fie genes in maize: expression pattern and imprinting suggest distinct functions. *Plant Cell* 15(2): 425–438.
- DAVID S.S., O'SHEA V.L. & KUNDU S. 2007: Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447(7147): 941–950.
- DAVIDSON R.M., HANSEY C.N., GOWDA M., CHILDS K.L., LIN H., VAILLANCOURT B., SEKHON R.S., LEON N. DE, KAEPLER S.M., JIANG N. & BUELL C.R. 2011: Utility of RNA Sequencing for Analysis of Maize Reproductive Transcriptomes. *The Plant Genome Journal* 4(3): 191.
- DICKINSON H., COSTA L. & GUTIERREZ-MARCOS J. 2012: Epigenetic neofunctionalisation and regulatory gene evolution in grasses. *Trends in Plant Science* 17(7): 389–394.
- FEIL R. & BERGER F. 2007: Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* 23(4): 192–199.
- FERGUSON-SMITH A.C. 2001: Imprinting and the Epigenetic Asymmetry Between Parental Genomes. *Science* 293(5532): 1086–1089.
- FLICEK P., AMODE M.R., BARRELL D., BEAL K., BRENT S., CARVALHO-SILVA D., CLAPHAM P., COATES G., FAIRLEY S., FITZGERALD S., GIL L., GORDON L., HENDRIX M., HOURLIER T., JOHNSON N., KAHARI A.K., KEEFE D., KEENAN S., KINSELLA R., KOMOROWSKA M., KOSCIELNY G., KULESHA E., LARSSON P., LONGDEN I., MCLAREN W., MUFFATO M., OVERDUIN B., PIGNATELLI M., PRITCHARD B., RIAT H.S., RITCHIE G.R.S., RUFFIER M., SCHUSTER M., SOBRAL D., TANG Y.A., TAYLOR K., TREVANION S., VANDROVCOVA J., WHITE S., WILSON M., WILDER S.P., AKEN B.L., BIRNEY E., CUNNINGHAM F., DUNHAM I., DURBIN R., FERNANDEZ-SUAREZ X.M., HARROW J., HERRERO J., HUBBARD T.J.P., PARKER A., PROCTOR G., SPUDICH G., VOGEL J., YATES A., ZADISSA A., SEARLE S.M.J., FLICEK P., AMODE M.R., BARRELL D., BEAL K., BRENT S., CARVALHO-SILVA D., CLAPHAM P., COATES G., FAIRLEY S., FITZGERALD S., GIL L., GORDON L., HENDRIX M., HOURLIER T., JOHNSON N., KÄHÄRI A.K., KEEFE D., KEENAN S., KINSELLA R., KOMOROWSKA M., KOSCIELNY G., KULESHA E., LARSSON P., LONGDEN I., MCLAREN W., MUFFATO M., OVERDUIN B., PIGNATELLI M., PRITCHARD B., RIAT H.S., RITCHIE G.R.S., RUFFIER M., SCHUSTER M., SOBRAL D., TANG Y.A., TAYLOR K., TREVANION S., VANDROVCOVA J., WHITE S., WILSON M., WILDER S.P., AKEN B.L., BIRNEY E., CUNNINGHAM F., DUNHAM I., DURBIN R., FERNÁNDEZ-SUAREZ X.M., HARROW J., HERRERO J., HUBBARD T.J.P., PARKER A., PROCTOR G., SPUDICH G., VOGEL J., YATES A., ZADISSA A. & SEARLE S.M.J. (2011 // 2012): *Ensembl* 2012. *Nucleic Acids Research*, 40:D84-90.
- FRAME B., MAIN M., SCHICK R. & WANG K. 2011: Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. *Methods Mol. Biol.* 710: 327–341.
- FRIEDMAN W.E. 2001: Developmental and evolutionary hypotheses for the origin of double fertilization and endosperm. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 324(6): 559–567.
- FRIIS E., PEDERSEN K.R. & CRANE P. 2006: Cretaceous angiosperm flowers: Innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 232(2-4): 251–293.
- FU A.Q., GENEREUX D.P., STÖGER R., BURDEN A.F., LAIRD C.D., STEPHENS M. & DEFOSSEZ P.-A. 2012: Statistical Inference of In Vivo Properties of Human DNA Methyltransferases from Double-Stranded Methylation Patterns. *PLoS ONE* 7(3): e32225.
- GARNIER O., LAOUIELLÉ-DUPRAT S. & SPILLANE C. 2008: Genomic imprinting in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 626: 89–100.
- GEHRING M., CHOI Y. & FISCHER R.L. 2004: Imprinting and seed development. *Plant Cell* 16(suppl_1): S203-13.
- GEHRING M. & HENIKOFF S. 2007: DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769(5-6): 276–286.

Literaturverzeichnis

- GEHRING M., HUH J.H., HSIEH T.-F., PENTERMAN J., CHOI Y., HARADA J.J., GOLDBERG R.B. & FISCHER R.L. 2006: DEMETER DNA Glycosylase Establishes MEDEA Polycomb Gene Self-Imprinting by Allele-Specific Demethylation. *Cell* 124(3): 495–506.
- GEHRING M., MISSIRIAN V. & HENIKOFF S. 2011: Genomic analysis of parent-of-origin allelic expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *PLoS ONE* 6(8): e23687.
- GENDLER K., PAULSEN T. & NAPOLI C. 2008: ChromDB: the chromatin database. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D298–302.
- GENEREUX D.P., MINER B.E., BERGSTROM C.T. & LAIRD C.D. 2005: A population-epigenetic model to infer site-specific methylation rates from double-stranded DNA methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(16): 5802–5807.
- GIBNEY E.R. & NOLAN C.M. 2010: Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* 105(1): 4–13.
- GRAW J. & HENNIG W. 2010: *Genetik*. 5th edn. Springer Berlin, Berlin, 620 S.
- GREGG C., ZHANG J., WEISSBOURD B., LUO S., SCHROTH G.P., HAIG D. & DULAC C. 2010: High-Resolution Analysis of Parent-of-Origin Allelic Expression in the Mouse Brain. *Science* 329(5992): 643–648.
- GROSSNIKLAUS U. 1998: Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in *Arabidopsis*. *Science* 280(5362): 446–450.
- GUTIERREZ-MARCOS J., CONSTÂNCIA M. & BURTON G. 2012: Maternal to offspring resource allocation in plants and mammals. *Placenta* 33: e3–e10.
- GUTIERREZ-MARCOS J.F. 2004: maternally expressed gene1 Is a Novel Maize Endosperm Transfer Cell-Specific Gene with a Maternal Parent-of-Origin Pattern of Expression. *THE PLANT CELL ONLINE* 16(5): 1288–1301.
- GUTIÉRREZ-MARCOS J.F., COSTA L.M., PRÀ M.D., SCHOLTEN S., KRANZ E., PEREZ P. & DICKINSON H.G. 2006: Epigenetic asymmetry of imprinted genes in plant gametes. *Nat Genet* 38(8): 876–878.
- GUTIERREZ-MARCOS J.F., PENNINGTON P.D., COSTA L.M. & DICKINSON H.G. 2003: Imprinting in the endosperm: a possible role in preventing wide hybridization. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358(1434): 1105–1111.
- GU Z., STEINMETZ L.M., GU X., SCHARFE C., DAVIS R.W. & LI W.-H. 2003: Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421(6918): 63–66 (eng).
- HAIG D. & WESTOBY M. 1989: Parent-Specific Gene Expression and the Triploid Endosperm. *American Naturalist*, The 134(1): 147.
- HAIG D. & WESTOBY M. 1991: Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 333(1266): 1–13.
- HAMILTON J.P. 2011: Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 29(2): 130–135 (eng).
- HANSEY C.N., VAILLANCOURT B., SEKHON R.S., LEON N. DE, KAEPLER S.M. & BUELL C.R. 2012: Maize (*Zea mays* L.) genome diversity as revealed by RNA-sequencing. *PLoS ONE* 7(3): e33071.
- HAUN W.J. & SPRINGER N.M. 2008: Maternal and paternal alleles exhibit differential histone methylation and acetylation at maize imprinted genes. *The Plant Journal* 56(6): 903–912.
- HE G., ZHU X., ELLING A.A., CHEN L., WANG X., GUO L., LIANG M., HE H., ZHANG H., CHEN F., QI Y., CHEN R. & DENG X.-W. 2010: Global Epigenetic and Transcriptional Trends among Two Rice Subspecies and Their Reciprocal Hybrids. *The Plant Cell* 22(1): 17–33.
- HENDERSON I.R., CHAN S.R., CAO X., JOHNSON L. & JACOBSEN S.E. 2010: Accurate sodium bisulfite sequencing in plants. *Epigenetics* 5(1): 47–49.
- HENIKOFF S. & COMAI L. 1998: A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149(1): 307–318.
- HENNIG L. & DERKACHEVA M. 2009: Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends in Genetics* 25(9): 414–423.

Literaturverzeichnis

- HERMON P., SRILUNCHANG K.-O., ZOU J., DRESSELHAUS T. & DANILEVSKAYA O.N. 2007: Activation of the imprinted Polycomb Group Fie1 gene in maize endosperm requires demethylation of the maternal allele. *Plant Mol. Biol.* 64(4): 387–395.
- HE X.-J., CHEN T. & ZHU J.-K. 2011: Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* 21(3): 442–465.
- HIGASHIYAMA T., YABE S., SASAKI N., NISHIMURA Y., MIYAGISHIMA S, KUROIWA H. & KUROIWA T. 2001: Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293(5534): 1480–1483.
- HÖFGEN R. & WILLMITZER L. 1988: Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16(20): 9877.
- HSIEH T.-F., SHIN J., UZAWA R., SILVA P., COHEN S., BAUER M.J., HASHIMOTO M., KIRKBRIDE R.C., HARADA J.J., ZILBERMAN D. & FISCHER R.L. 2011: Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(5): 1755–1762.
- HUH J.H., BAUER M.J., HSIEH T.-F. & FISCHER R. 2007: Endosperm gene imprinting and seed development. *Current Opinion in Genetics & Development* 17(6): 480–485.
- HUH J.H., BAUER M.J., HSIEH T.-F. & FISCHER R.L. 2008: Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell* 132(5): 735–744.
- HUTTER B., BIEG M., HELMS V. & PAULSEN M. 2010: Imprinted genes show unique patterns of sequence conservation. *BMC Genomics* 11(1): 649.
- IKEDA Y. 2012: Plant imprinted genes identified by genome-wide approaches and their regulatory mechanisms. *Plant Cell Physiol.* 53(5): 809–816.
- ISHIKAWA R., OHNISHI T., KINOSHITA Y., EIGUCHI M., KURATA N. & KINOSHITA T. 2011: Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65(5): 798–806.
- JAHNKE S. & SCHOLTEN S. 2009: Epigenetic Resetting of a Gene Imprinted in Plant Embryos. *Current Biology* 19(19): 1677–1681.
- JIANG H. & KOHLER C. 2012: Evolution, function, and regulation of genomic imprinting in plant seed development. *Journal of Experimental Botany* 63(13): 4713–4722.
- JULLIEN P.E. 2006: Maintenance of DNA Methylation during the *Arabidopsis* Life Cycle Is Essential for Parental Imprinting. *THE PLANT CELL ONLINE* 18(6): 1360–1372.
- KANKEL M.W., RAMSEY D.E., STOKES T.L., FLOWERS S.K., HAAG J.R., JEDDELOH J.A., RIDDLE N.C., VERBSKY M.L. & RICHARDS E.J. 2003: *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163(3): 1109–1122.
- KEMPKEN F. & KEMPKEN R. 2012: Gentechnik bei Pflanzen. Chancen und Risiken.
- KERMICLE J.L. 1970: Dependence of the R-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. *Genetics* 66(1): 69–85.
- KINOSHITA T., MIURA A., CHOI Y., KINOSHITA Y., CAO X., JACOBSEN S.E., FISCHER R.L. & KAKUTANI T. 2004: One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* 303(5657): 521–523.
- KNIPPERS R. 2006: *Molekulare Genetik*. 9th edn. Thieme, Stuttgart, XVII, 567 S.
- KOHLER C. 2003a: *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO Journal* 22(18): 4804–4814.
- KOHLER C. 2003b: The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes & Development* 17(12): 1540–1553.
- KÖHLER C. & GROSSNIKLAUS U. 2002: Epigenetic inheritance of expression states in plant development: the role of Polycomb group proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14(6): 773–779.
- Köhler C. & Makarevich G. 2006: Epigenetic mechanisms governing seed development in plants. *EMBO Rep.* 2006 December; 7(12): 1223–1227.
- KÖHLER C., PAGE D.R., GAGLIARDINI V. & GROSSNIKLAUS U. 2004: The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb group protein controls expression of PHERES1 by parental imprinting. *Nat Genet.* 37, 28 - 30
- KÖHLER C., WOLFF P. & SPILLANE C. 2012: Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63: 331–352.

Literaturverzeichnis

- KOONIN E.V. 2005: Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* 39: 309–338.
- KRANZ E., BAUTOR J. & LÖRZ H. 1991: In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sexual Plant Reprod* 4(1).
- KRANZ E., KRANZ, VON WIEGEN P, QUADER & LORZ 1998: Endosperm Development after Fusion of Isolated, Single Maize Sperm and Central Cells in Vitro. *THE PLANT CELL ONLINE* 10(4): 511–524.
- LAI J., LI R., XU X., JIN W., XU M., ZHAO H., XIANG Z., SONG W., YING K., ZHANG M., JIAO Y., NI P., ZHANG J., LI D., GUO X., YE K., JIAN M., WANG B., ZHENG H., LIANG H., ZHANG X., WANG S., CHEN S., LI J., FU Y., SPRINGER N.M., YANG H., WANG J., DAI J., SCHNABLE P.S. & WANG J. 2010: Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. *Nat Genet* 42(11): 1027–1030.
- LAIRD C.D., PLEASANT N.D., CLARK A.D., SNEEDEN J.L., HASSAN K.M.A., MANLEY N.C., VARY J.C., MORGAN T., HANSEN R.S. & STÖGER R. 2004: Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(1): 204–209.
- LAMESCH P., BERARDINI T.Z., LI D., SWARBRECK D., WILKS C., SASIDHARAN R., MULLER R., DREHER K., ALEXANDER D.L., GARCIA-HERNANDEZ M., KARTHIKEYAN A.S., LEE C.H., NELSON W.D., PLOETZ L., SINGH S., WENSEL A. & HUALA E. 2011: The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research* 40(D1): D1202–D1210.
- LANZUOLO C., ROURE V., DEKKER J., BANTIGNIES F. & ORLANDO V. 2007: Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex. *Nat. Cell Biol.* 9(10): 1167–1174.
- LAW J.A. & JACOBSEN S.E. 2010: Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11(3): 204–220.
- LEONHARDT H., PAGE A.W., WEIER H.-U. & BESTOR T.H. 1992: A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71(5): 865–873.
- LÊ Q., GUTIÉRREZ-MARCOS J.F., COSTA L.M., MEYER S., DICKINSON H.G., LÖRZ H., KRANZ E. & SCHOLTEN S. 2005: Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *The Plant Journal* 44(1): 167–178.
- LI E. 2002: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3(9): 662–673.
- LINDROTH A.M. 2001: Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation. *Science* 292(5524): 2077–2080.
- LIU X. 2006: Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA* 12(8): 1514–1520.
- LUO M., BILODEAU P., DENNIS E.S., PEACOCK W.J. & CHAUDHURY A. 2000: Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(19): 10637–10642.
- LUO M., PLATTEN D., CHAUDHURY A., PEACOCK W.J. & DENNIS E.S. 2009: Expression, imprinting, and evolution of rice homologs of the polycomb group genes. *Mol Plant* 2(4): 711–723.
- LUO M., TAYLOR J.M., SPRIGGS A., ZHANG H., WU X., RUSSELL S., SINGH M. & KOLTUNOW A. 2011: A genome-wide survey of imprinted genes in rice seeds reveals imprinting primarily occurs in the endosperm. *PLoS Genet.* 7(6): e1002125.
- LUO S. 2003: Strand-biased DNA methylation associated with centromeric regions in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(19): 11133–11138.
- MACDONALD W.A. 2012: Epigenetic Mechanisms of Genomic Imprinting: Common Themes in the Regulation of Imprinted Regions in Mammals, Plants, and Insects. *Genetics Research International* 2012(1): 1–17.
- MAKAREVICH G., VILLAR C.B.R., ERILOVA A. & KOHLER C. 2008: Mechanism of PHERES1 imprinting in Arabidopsis. *Journal of Cell Science* 121(6): 906–912.

Literaturverzeichnis

- MAKAREVITCH I., STUPAR R.M., INIGUEZ A.L., HAUN W.J., BARBAZUK W.B., KAEPLER S.M. & SPRINGER N.M. 2007: Natural variation for alleles under epigenetic control by the maize chromomethylase *zmet2*. *Genetics* 177(2): 749–760.
- MÁRTON M.L., FASTNER A., UEBLER S. & DRESSELHAUS T. 2012: Overcoming Hybridization Barriers by the Secretion of the Maize Pollen Tube Attractant ZmEA1 from Arabidopsis Ovules. *Current Biology* 22(13): 1194–1198.
- MATRANGA C., TOMARI Y., SHIN C., BARTEL D.P. & ZAMORE P.D. 2005: Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* 123(4): 607–620.
- MCGRATH J. & SOLTER D. 1984: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37(1): 179–183.
- MCKEOWN P.C., LAOUIELLE-DUPRAT S., PRINS P., WOLFF P., SCHMID M.W., DONOGHUE M.T.A., FORT A., DUSZYNSKA D., COMTE A., LAO N., WENNBLOM T.J., SMANT G., KÖHLER C., GROSSNIKLAUS U. & SPILLANE C. 2011: Identification of imprinted genes subject to parent-of-origin specific expression in Arabidopsis thaliana seeds. *BMC Plant Biol* 11(1): 113.
- MEINKE D. & KOORNNEEF M. 1997: Community standards for Arabidopsis genetics. *Plant J* 12(2): 247–253.
- MEYER S., POSPISIL H. & SCHOLTEN S. 2007: Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol* 63(3): 381–391.
- MINER B.E., STÖGER R.J., BURDEN A.F., LAIRD C.D. & HANSEN R.S. 2004: Molecular barcodes detect redundancy and contamination in hairpin-bisulfite PCR. *Nucleic Acids Res.* 32(17): e135.
- MISHIBA K.-I., NISHIHARA M., NAKATSUKA T., ABE Y., HIRANO H., YOKOI T., KIKUCHI A. & YAMAMURA S. 2005: Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *The Plant Journal* 44(4): 541–556.
- MISHIBA K.-I., YAMASAKI S., NAKATSUKA T., ABE Y., DAIMON H., ODA M., NISHIHARA M. & MEYER P. 2010: Strict De Novo Methylation of the 35S Enhancer Sequence in Gentian. *PLoS ONE* 5(3): e9670.
- MITTELBERGER F. 2010: Untersuchung der gewebespezifischen und subzellulären Lokalisation von MEE1. Masterarbeit. Universität Hamburg
- MONACO M.K., SEN T.Z., DHARMAWARDHANA P.D., REN L., SCHAEFFER M., NAITHANI S., AMARASINGHE V., THOMASON J., HARPER L., GARDINER J., CANNON E.K., LAWRENCE C.J., WARE D. & JAISWAL P. (2013): Maize Metabolic Network Construction and Transcriptome Analysis. *The Plant Genome* 6(1): 0.
- MORALES-RUIZ T. 2006: DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(18): 6853–6858.
- MORISON I.M., RAMSAY J.P. & SPENCER H.G. 2005: A census of mammalian imprinting. *Trends Genet.* 21(8): 457–465.
- MOSHER R.A. & MELNYK C.W. 2010: siRNAs and DNA methylation: seedy epigenetics. *Trends Plant Sci.* 15(4): 204–210.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473–497.
- NODINE M.D. & BARTEL D.P. 2012: Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482(7383): 94–97.
- OLSEN O.-A. 2004: Nuclear endosperm development in cereals and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16: S214–27.
- PANG S. 1996: An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *PLANT PHYSIOLOGY* 112(3): 893–900.
- PASSARGE E., HORSTHEMKE B. & FARBER R.A. 1999: Incorrect use of the term synteny. *Nat. Genet.* 23(4): 387.
- PUNTA M., COGGILL P.C., EBERHARDT R.Y., MISTRY J., TATE J., BOURSNELL C., PANG N., FORSLUND K., CERIC G., CLEMENTS J., HEGER A., HOLM L., SONNHAMMER E.L.L., EDDY S.R.,

Literaturverzeichnis

- BATEMAN A. & FINN R.D. (2011): The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1): D290–D301.
- RADIVOJAC P., VACIC V., HAYNES C., COCKLIN R.R., MOHAN A., HEYEN J.W., GOEBL M.G. & IAKOUCHEVA L.M. 2010: Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78(2): 365–380.
- RAISSIG M.T., BAROUX C. & GROSSNIKLAS U. 2011: Regulation and Flexibility of Genomic Imprinting during Seed Development. *The Plant Cell* 23(1): 16–26.
- REIK W., DEAN W. & WALTER J. 2001: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532): 1089–1093.
- REIK W. & WALTER J. 2001: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2(1): 21–32.
- ROBERTS R.J. & CHENG X. 1998: BASE FLIPPING. *Annu. Rev. Biochem.* 67(1): 181–198.
- ROBINSON J.T., THORVALDSDÓTTIR H., WINCKLER W., GUTTMAN M., LANDER E.S., GETZ G. & MESIROV J.P. 2011: Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29(1): 24–26.
- ROME S., MEUGNIER E. & VIDAL H. 2004: The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(3): 249–254.
- SABELLI P.A. & LARKINS B.A. 2009: The Development of Endosperm in Grasses. *PLANT PHYSIOLOGY* 149(1): 14–26.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. & SAMBROOK-FRITSCH-MANIATIS (1989): Molecular cloning. A laboratory manual; [prepared for use in the CSH courses on the molecular cloning of eukaryotic genes]. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- SALINAS J. 2006: Arabidopsis protocols. 2nd edn. Humana Press, Totowa, N.J, Online-Ressource.
- SARGANT E. 1900: Recent work on the results of fertilization. *Ann Bot* 14 (4): 689-712.
- SCHNABLE P.S., WARE D., FULTON R.S., STEIN J.C., WEI F., PASTERNAK S., LIANG C., ZHANG J., FULTON L., GRAVES T.A., MINX P., REILY A.D., COURTNEY L., KRUCHOWSKI S.S., TOMLINSON C., STRONG C., DELEHAUNTY K., FRONICK C., COURTNEY B., ROCK S.M., BELTER E., DU F., KIM K., ABBOTT R.M., COTTON M., LEVY A., MARCHETTO P., OCHOA K., JACKSON S.M., GILLAM B., CHEN W., YAN L., HIGGINBOTHAM J., CARDENAS M., WALIGORSKI J., APPLEBAUM E., PHELPS L., FALCONE J., KANCHI K., THANE T., SCIMONE A., THANE N., HENKE J., WANG T., RUPPERT J., SHAH N., ROTTER K., HODGES J., INGENTHON E., CORDES M., KOHLBERG S., SGRO J., DELGADO B., MEAD K., CHINWALLA A., LEONARD S., CROUSE K., COLLURA K., KUDRNA D., CURRIE J., HE R., ANGELOVA A., RAJASEKAR S., MUELLER T., LOMELI R., SCARA G., KO A., DELANEY K., WISSOTSKI M., LOPEZ G., CAMPOS D., BRAIDOTTI M., ASHLEY E., GOLSER W., KIM H., LEE S., LIN J., DUJMIC Z., KIM W., TALAG J., ZUCCOLO A., FAN C., SEBASTIAN A., KRAMER M., SPIEGEL L., NASCIMENTO L., ZUTAVERN T., MILLER B., AMBROISE C., MULLER S., SPOONER W., NARECHANIA A., REN L., WEI S., KUMARI S., FAGA B., LEVY M.J., MCMAHAN L., VAN BUREN P., VAUGHN M.W., YING K., YEH C.-T., EMRICH S.J., JIA Y., KALYANARAMAN A., HSIA A.-P., BARBAZUK W.B., BAUCOM R.S., BRUTNELL T.P., CARPITA N.C., CHAPARRO C., CHIA J.-M., DERAGON J.-M., ESTILL J.C., FU Y., JEDDELOH J.A., HAN Y., LEE H., LI P., LISCH D.R., LIU S., LIU Z., NAGEL D.H., MCCANN M.C., SANMIGUEL P., MYERS A.M., NETTLETON D., NGUYEN J., PENNING B.W., PONNALA L., SCHNEIDER K.L., SCHWARTZ D.C., SHARMA A., SODERLUND C., SPRINGER N.M., SUN Q., WANG H., WATERMAN M., WESTERMAN R., WOLFGRUBER T.K., YANG L., YU Y., ZHANG L., ZHOU S., ZHU Q., BENNETZEN J.L., DAWE R.K., JIANG J., JIANG N., PRESTING G.G., WESSLER S.R., ALURU S., MARTIENSSSEN R.A., CLIFTON S.W., MCCOMBIE W.R., WING R.A. & WILSON R.K. 2009: The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326(5956): 1112–1115.
- SCHOFT V.K., CHUMAK N., CHOI Y., HANNON M., GARCIA-AGUILAR M., MACHLICOVA A., SLUSARZ L., MOSIOLEK M., PARK J.-S., PARK G.T., FISCHER R.L. & TAMARU H. 2011: Function of the DEMETER DNA glycosylase in the Arabidopsis thaliana male gametophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(19): 8042–8047.
- SCHOLTEN S. 2010: Genomic imprinting in plant embryos. *Epigenetics* 5(6): 455–459.
- SCHUETTENGROBER B. & CAVALLI G. 2009: Recruitment of Polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 136(21): 3531–3542.

Literaturverzeichnis

- SCOTT R.J. & SPIELMAN M. 2006: Genomic imprinting in plants and mammals: how life history constrains convergence. *Cytogenet. Genome Res.* 113(1-4): 53–67.
- SCOTT R.J., SPIELMAN M., BAILEY J. & DICKINSON H.G. 1998: Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125(17): 3329–3341.
- SEKHON R.S., LIN H., CHILDS K.L., HANSEY C.N., BUELL C.R., LEON N. DE & KAEPLER S.M. 2011: Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66(4): 553–563.
- SELINGER D.A. & CHANDLER V.L. 2001: B-Bolivia, an allele of the maize b1 gene with variable expression, contains a high copy retrotransposon-related sequence immediately upstream. *Plant Physiol.* 125(3): 1363–1379.
- SHA K. 2008: A mechanistic view of genomic imprinting. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 197–216.
- SHAO C., LACEY M., DUBEAU L. & EHRLICH M. 2009: Hemimethylation footprints of DNA demethylation in cancer. *Epigenetics* 4(3): 165–175.
- SITTE P. & STRASBURGER E. (2002): *Lehrbuch der Botanik. Für Hochschulen: begründet von E. Strasburger ...* [et al. 35th edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, XIV, 1123 str.
- SIOMI H. & SIOMI M.C. 2009: On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457(7228): 396–404.
- SMITH N.A., SINGH S.P., WANG M.B., STOUTJESDIJK P.A., GREEN A.G. & WATERHOUSE P.M. 2000: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407(6802): 319–320.
- SODERLUND C., BOMHOFF M. & NELSON W.M. 2011: SyMAP v3.4: a turnkey synteny system with application to plant genomes. *Nucleic Acids Research* 39(10): e68.
- SOPPE W.J., JACOBSEN S.E., ALONSO-BLANCO C., JACKSON J.P., KAKUTANI T., KOORNNEEF M. & 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(4): 791–802.
- SPRINGER N.M., DANILEVSKAYA O.N., HERMON P., HELENTJARIS T.G., PHILLIPS R.L., KAEPLER H.F. & KAEPLER S.M. 2002: Sequence Relationships, Conserved Domains, and Expression Patterns for Maize Homologs of the Polycomb Group Genes *E(z)*, *esc*, and *E(Pc)*. *PLANT PHYSIOLOGY* 128(4): 1332–1345.
- SPRINGER N.M. & STUPAR R.M. 2007: Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? *Genome Res.* 17(3): 264–275.
- SURANI M.A.H., BARTON S.C. & NORRIS M.L. 1984: Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308(5959): 548–550.
- THORVALDSDOTTIR H., ROBINSON J.T. & MESIROV J.P. 2013: Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14(2): 178–192.
- TRAPNELL C., ROBERTS A., GOFF L., PERTEA G., KIM D., KELLEY D.R., PIMENTEL H., SALZBERG S.L., RINN J.L. & PACTER L. 2012: Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7(3): 562–578.
- VARMUZA S. & MANN M. 1994: Genomic imprinting — defusing the ovarian time bomb. *Trends in Genetics* 10(4): 118–123.
- VILLAR C.B.R., ERILOVA A., MAKAREVICH G., TRÖSCH R. & KÖHLER C. 2009: Control of *PHERES1* imprinting in *Arabidopsis* by direct tandem repeats. *Mol Plant* 2(4): 654–660 (eng).
- WASSENEGGER M., HEIMES S., RIEDEL L. & SÄNGER H.L. 1994: RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76(3): 567–576.
- WATERHOUSE P.M. & HELLIWELL C.A. 2003: Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 4(1): 29–38.
- WATERS A.J., MAKAREVITCH I., EICHTEN S.R., SWANSON-WAGNER R.A., YEH C.-T., XU W., SCHNABLE P.S., VAUGHN M.W., GEHRING M. & SPRINGER N.M. 2011: Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *Plant Cell* 23(12): 4221–4233.
- WEINHOFER I., HEHENBERGER E., ROSZAK P., HENNIG L., KÖHLER C. & KAKUTANI T. 2010: H3K27me3 Profiling of the Endosperm Implies Exclusion of Polycomb Group Protein Targeting by DNA Methylation. *PLoS Genet* 6(10): e1001152.

Literaturverzeichnis

- WEINHOLD A., KALLENBACH M. & BALDWIN I.T. 2013: Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants. *BMC Plant Biol* 13(1): 99.
- WIERZBICKI A.T., HAAG J.R. & PIKAARD C.S. 2008: Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell* 135(4): 635–648.
- WOLFF P., WEINHOFFER I., SEGUIN J., ROSZAK P., BEISEL C., DONOGHUE M.T.A., SPILLANE C., NORDBORG M., REHMSMEIER M. & KÖHLER C. 2011: High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the *Arabidopsis* Endosperm. *PLoS Genet.* 7(6): e1002126.
- XIAO W., GEHRING M., CHOI Y., MARGOSSIAN L., PU H., HARADA J.J., GOLDBERG R.B., PENNELL R.I. & FISCHER R.L. 2003: Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev. Cell* 5(6): 891–901.
- XIE Z., JOHANSEN L.K., GUSTAFSON A.M., KASSCHAU K.D., LELLIS A.D., ZILBERMAN D., JACOBSEN S.E. & CARRINGTON J.C. 2004: Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *Plos Biol* 2(5): e104.
- YAMASAKI S., ODA M., KOIZUMI N., MITSUKURI K., JOHKAN M., NAKATSUKA T., NISHIHARA M. & MISHIBA K.-I. 2011: De novo DNA methylation of the 35S enhancer revealed by high-resolution methylation analysis of an entire T-DNA segment in transgenic gentian. *Plant Biotechnology* 28(2): 223–230.
- YE J., COULOURIS G., ZARETSKAYA I., CUTCUTACHE I., ROZEN S. & MADDEN T.L. 2012: Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- YOUENS-CLARK K., BUCKLER E., CASSTEVENS T., CHEN C., DECLERCK G., DERWENT P., DHARMAWARDHANA P., JAISWAL P., KERSEY P., KARTHIKEYAN A.S., LU J., MCCOUCH S.R., REN L., SPOONER W., STEIN J.C., THOMASON J., WEI S., WARE D., YOUENS-CLARK K., BUCKLER E., CASSTEVENS T., CHEN C., DECLERCK G., DERWENT P., DHARMAWARDHANA P., JAISWAL P., KERSEY P., LU J., MCCOUCH S.R., REN L., SPOONER W., STEIN J.C., THOMASON J., WEI S. & WARE D. 2010 // 2011: Gramene database in 2010: updates and extensions. *Nucleic Acids Research*, 39:D1085-94.
- ZARATIEGUI M., IRVINE D.V. & MARTIENSSEN R.A. 2007: Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell* 128(4): 763–776.
- ZHANG M., ZHAO H., XIE S., CHEN J., XU Y., WANG K., ZHAO H., GUAN H., HU X., JIAO Y., SONG W. & LAI J. 2011: Extensive, clustered parental imprinting of protein-coding and noncoding RNAs in developing maize endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(50): 20042–20047.
- ZHANG Y. 2003: Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & Development* 17(22): 2733–2740.
- ZHU J.-K. 2009: Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43(1): 143–166.
- ZRZAVÝ J., STORCH D. & MIHULKA S. 2009: Evolution. Dt. Ausg. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, XIII, 493 S.

12 Anhang

12.1 verwendete Oligonukleotide

Tabelle 9: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid-Bezeichnung	Mais Identifikations-Nummer	Sequenz in 5'-3' Richtung	T _m (C°)	Verwendung
Aktin_ex2+3 for		TCAACCCCAAGGCCAACAGAG	59	Expressionskontrolle
Aktin_ex2+3 rev		GAGGTCACGCCCCGCAAGAT	61	
M13 for		TGTA AACGACGGCCAGT	49	Bakterien-Screening
M13 rev		CAGGAAACAGCTATGACC	42	
pJet for		CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	66	
pJet rev		AAGAACATCGATTTCCATGGCAG	59	
SMARTII A Oligonukleotid		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	42	SMART-cDNA-Synthese
3' SMART CDS Primer II A		AAGCAGTGTATCAACGCAGAGTACT	42	
5' PCR Primer II A		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	65	
oligo (dt)18		TTTTTTTTTTTTTTTTTT		cDNA-Synthese
DNG101for		GATCGATGCCCCAAGACA	55	DNG Expressionsanalysen
DNG101rev		AAAGCCCTCACGCAAACAA	57	
DNG102for		AAAGCCCTCACGCAAACAA	51	
DNG102rev		ACGCGCGATGAGGTTACA	51	
DNG105 up		ATTTCTGCTTAGTATACATGGGATTGGAGT	67	
DNG105 low		GCACCGTTTAAGGGCTGAAGTTTG	65	
G_SpF		TAC CTC GCA TTA CCC TTA CGC TGA A	66	Spacer Kontrolle
G_SpR		AAT CGC CGC TTT GGA CAT ACC	61	
meeDMR A fwd 3'		AAR CTC ATR RCT AAR CAT ARA CAA C	60	mee1 Hemimethylierung
meeDMR A rev 5'		TAA GYA TAG AYA AYA TGA YYA AGA TT	58	
meeDMR A in fwd 3'		TAT ACC RAG TTT RRT RAC ACA ARA ATA C	62	
meeDMR A in rev 5'		TAT GTA GGA GAA AGA AYA YAA ATA GA	58	
meeDMR B fwd 3'		AAT CTT RRT CAT RTT RTC TAT RCT TA	58	
meeDMR B rev 5'		GTT GTY TAT GYT TAG YYA TGA GYT T	60	
meeDMR B in fwd 3'		AAC TAC RCC TCR CAC AAC CCA CA	65	
meeDMR B in rev 5'		AAG YAA TGY GGG GAG YAY GGT ATT	64	
meeDMR C fwd 3'		TAC CTA RAT ATA CAT RAT AAA ATA TAT T	55	
meeDMR C rev 5'		GAT AAA ATA TAT TAG GAT YYT AAA AAT T	55	
meeDMR C in fwd 3'		AAT ATA CAA TAT TTC TTT TAC TAA AAT T	54	
meeDMR C in rev 5'		TAA AAT ATT TGA TGA AGG TTG ATA ATA	56	
meeDMR A BanI Adap		Pho-GTG CTA GCG ATG CGT TCG AGC ATC GCT A	73	
meeDMR B SacI Adap		Pho-TAG CGA TGC GTT CGA GCA TCG CTA AGC TC	73	
meeDMR C BanI Adap		Pho-GCA CTA GCG ATG CGT TCG AGC ATC GCT A	73	
meeDMR C_for2		ATC TTT CAT ARC CTA ATA TRA TAA ATA T	57	
meeDMR C_for3		CAR AAR TCT TTC ATC TTT AAA ATC TTC A	60	
meeDMR C_rev2		TYT TTC TYY TAY ATA GTT GTA TTY TTG T	59	

Anhang

meeDMR_C_rev3		AAA GTT YYA CAA YYA AAA ATA TYA AAT A	56	
meeDMR_B_for4		TCTTTCATCTTTAAAATCTTCA	51	
meeDMR_B_for5		ATTATCATACAATCTTTCATA	48	
meeDMR_B_for6		TATATCTAATRCCACATRTCAATCTT	58	
meeDMR_B_rev 4		TAATATGATAAAATATYTATTTGTGTT	53	
meeDMR_B_rev5		TTGTGGAGGAAYGGTAAAYAATGGTGG	66	
meeDMR B Sac/BanII Adap		TAGCGATGCGTTCGAGCATCGCTAAGCT	72	
meeDMR FokI Adapter		TTGGTAGCGATGCGTTCGAGCATCGCTA	72	
OC6_Afl_for		GAT GAG CTT GTG GAG GAA	54	mee1 Expressionskontrolle
OC6 GFP_re		TCA CTT GTA GAG TTC ATC CA	54	
SALK_048394 LP		CAACAAAATGGAATAACAGTTAAAGC	60	Arabid. Genotypisierung
SALK_048394 RP		CAGGTCTTCTTCTTGCCTCTG	61	
SALK_093234 LP		GCCAAGCATGGTCATAGTTTC	59	
SALK_093234 RP		TGTTCTCCGACTCATCTCTC	61	
mee-Genotyp1,2-RP		AAC GCC TAA GCT CAA GCA ATC	60	
mee-Genotyp1,2-LP		CTT TTT CTG GGG ATC AGG ATC	60	
EMBI1_1 for	AC211403.4_Fg005	TGGTGGGTGTGGGCCAAAGG	65	EMB Polymorp.- Suche
EMBI1_1 rev		GCTCCACGGAGCTTGCGCTT	65	
EMBI_1_2 for		ATCGCAAGCCCCTCGTGTGC	65	
EMBI_1_2 rev		TGGGTTCGTCGTGTGGGTCTT	65	
EMBI_1_3 for		CAGACCAAGCAAGGCTGGTA	60	
EMBI_1_3 rev		AGCTGATGATTGGGTGGCA	58	
EMBI_2_1 for	GRMZM2G028366	GCCTTCCGCGTCCACCAAAA	65	
EMBI_2_1 rev		GTGCCTCCGTGGTCAGTGGC	67	
EMBI_2_2 for		TTGTACCGACACCCGACTTG	60	
EMBI_2_2 rev		GCACTTGCAAAAAGCTCGTGA	58	
EMBI_3_1 for	GRMZM2G093947	TAGCCGCCCAACAACGCC	65	
EMBI_3_1 rev		ATGCCACCGACCCAAGAGC	65	
EMBI_3_2 for		TGAGTGGGAGACGTGCTTGAGGA	66	
EMBI_3_2 rev		GGCATTAGGTCTGCACTCCAGC	68	
EMBI_3_3 for		GCAATAATGGGCAACACGCA	58	
EMBI_3_3 rev		GGTCCTTATCGGGCTCTTGG	63	
EMBI_5_1 for	GRMZM2G365731	CCTTGTGGCGACCAGCCCAG	67	
EMBI_5_1 rev		AGCGGCTCCGATCACCACCT	65	
EMBI_5_2 for		AGATCACCGATGGTCCAGAG	60	
EMBI_5_2 rev		GGCGAGGAACAGACTGACAA	60	
EMBI_6_1 for	GRMZM2G014119	GCCGCAACCTGACACGGAGG	67	
EMBI_6_1 rev		GTGAAAGGGCAGACCGGGGC	67	
EMBI_6_2 for		TGGCTTCGAATCGGAGATGG	60	
EMBI_6_2 rev		AAATGCCCTCCTTGTCTGG	60	
EMBI_7_1 for	GRMZM2G014256	TCAGCCTCTGGTGGTCAGGCA	65	
EMBI_7_1 rev		CCCCGAGTCCCCTGCTTC	69	
EMBI_7_2 for		TCTAGCAACCACCCCTCAGA	60	

Anhang

EMBI_7_2 rev		CGGTTCCGGACTTTTGCTTCG	60	
EMBI_8_1 for	GRMZM2G118205	AAGCGTAGGCCTGGGGAGGG	67	
EMBI_8_1 rev		ACGCAGAACAAAACAGACGGCA	65	
EMBI_8_2 for		CCCGTCTTAATTGACCGGCT	60	
EMBI_8_2 rev		CATCCAGCACAGCATCTCCA	60	
EMBI_9_1 for	GRMZM2G130580	GCTTGTAACTCCACCACCGA	60	
EMBI_9_1 rev		CCACCCCTTGCCATCATTCT	60	
EMBI10_1 for	GRMZM2G136364	AGACGTGTGGCGGAGCTTGC	65	
EMBI10_1 rev		TCGGCGAGGTTGCAGCGTTT	63	
EMBI_10_2 for		GAGCCGGCTGAGACGTG	60	
EMBI_10_2 rev		GACTGACAGACACGGACTCG	63	
EMBI_10_3 for		AGACGTGTGGCGGAGCTTG	62	
EMBI_10_3 rev		TGCACATGTCTGGTACTCGC	60	
EMBI_11_1 for	GRMZM2G354579	ACTGCCACCAGCACACCATCA	63	
EMBI_11_1 rev		TGGAGTGGAGAAGGGGATTGCT	66	
EMBI_11_2 for		ATCATGGTTGCGTCGTTTGC	58	
EMBI_11_2 rev		AGGTGTTTGGTGGCTTTCCA	58	
EMBI_11_3 for		TCCCATATGCAAGCAGCCAA	58	
EMBI_11_3 rev		GGGCCTCTCTATGACTGCAC	63	
EMBI_12_1 for	GRMZM2G370991	CATGGGGCTACCACCTTTGT	60	
EMBI_12_1 rev		GGTGGCCTCAACTTCCATCA	60	
EMBI_12_2 for		GTGGAAGCTGTGCTGGAGAT	60	
EMBI_12_2 rev		TCGGTTCACAAGCCATAACC	60	
EMBI_14_1 for	GRMZM2G083932	TTAACGAGCTTGCGGAGTGA	58	
EMBI_14_1 rev		ACACATCACACAAGGCCCAA	58	
EMBI_14_2 for		GTACCGCTGGAACGACTAGG	63	
EMBI_14_2 rev		GAGGACCTTGAGCCACAAA	60	
RI_SNP-KO1_for	GRMZM2G155943	GCA AGG GCA GGG ATG GCC C	66	nicht imp. Gene/Kontrolle
RI_SNP-KO1_rev		TGG TGG ACC TTC ACA GGG CA	63	
RI_SNP-KO2_for	GRMZM2G517332	TCA GAC CTT GGG CTG GCG GA	65	
RI_SNP-KO2_rev		TAC CAC CCT AGT TCC AGC ACA CA	65	
RI_SNP-KO3_for	GRMZM2G104384	AGG AGG AAC ACT GCG CCA GC	65	
RI_SNP-KO3_rev		TGG CGA GCA AGA TCG GCC AC	65	
RI_SNP_KO_4_for	GRMZM2G155943	AAGGGGAAGCCCAGGCCGAA	65	
RI_SNP_KO_4_rev		CCCGGGGTTGTGAAGCCTGC	67	
RI_SNP_KO_5_for	GRMZM2G104384	GGACCGGTGCCACCCTCTCT	67	
RI_SNP_KO_5_rev		ACCACCCCAAAGCCCCTGT	65	
RI_SNP_KO_6_for	GRMZM2G150631	TTGGCGGCACAACACTGCAGGG	65	
RI_SNP_KO_6_rev		CCGGGCCGCTAAAAGTCCCG	65	
RI_SNP_KO_7_for	GRMZM2G124096	TGTGCTGGCTGGCTGTTCCGG	65	
RI_SNP_KO_7_rev		CCACCCGTGAGTCCCCTGA	67	
RI_SNP_KO_8_for	GRMZM2G153215	GCCCCGCCCATGCTGTGAAG	67	
RI_SNP_KO_8_rev		CGCGGACCAGCAAAGCAAGC	65	

Anhang

RI_SNP_KO_9 for	GRMZM2G021587	ATCCATCCTTTGCAACCTTGGTGCT	66	
RI_SNP_KO_9 rev		TCTTGCCGTGCGCCTTCCAG	65	
RI_SNP_KO_10for	GRMZM2G462140	CCCTGGTCCCATGCTTGCCC	67	
RI_SNP_KO_10rev		AGCCAAGGAAGCACAAAACCCCG	66	
RI_zmmeef	AC219159.3_FG002	TGC CAC ATG TCA ATC TTG GTC ATG T	64	
RI_zmmeer		GCC TCC CTT CAC TTG CTC TAG CC	68	
fie PshA1 for	GRMZM2G118205	AACCAGATGGCAATAGGCAACAATAA	59	
fie PshA1 rev		GCATAACAAACAGCAGCATCCTAACA	59	
meg1 for	GRMZM2G354335	GTGGATGCGCTAGTGTITTTCTCT	56	
meg1 rev		TAAGCCTCTAGTATCGGTCTGA	48	
RI_2_1 for	GRMZM2G357737	TGC CCA GGA ACA ACC GAC ACG	65	END Polymorp.- Suche
RI_2_1 rev		TCT GTT GGC ATC AGG CGG CC	65	
RI_2_2 for		GGC ATG CCA GCA GAA GAG CAG G	68	
RI_2_2 rev		CGG CGT GGA CCC TTG TTG CA	65	
RI_5_1 for	GRMZM2G361398	AAA GGC TGG CCG CTC ACG CAG	67	
RI_5_1 rev		GCC CTC CGG TGG CAA GAA GTTT	66	
RI_6_1 for	GRMZM2G042099	CCG TCA GAG GTG TTG CCC AGG	67	
RI_6_1 rev		GCC CAA AGATCG GTT GAA CAC ATG C	67	
RI_7a_1 for	GRMZM5G897988	CCA GCT CCC GAG CAC CTG TC	67	
RI_7a_1 rev		GGG GTT CAA AAC CGC CAC TCA	63	
RI_7b_1 for	GRMZM2G148115	ACC CCT GAT GAC GCC CGG AG	67	
RI_7b_1 rev		CGG CCA CTC TAG TCT CTA TGC AGT	67	
RI_8a_1 for	GRMZM2G064107	CAA ATG CGC GCC CCC ACC TA	65	
RI_8a_1 rev		TGA AAT CCG TTG TTT GGA TGG CCA	64	
RI_8a_2 for		ATG GCC ATC CAA ACA ACG GAT TTC A	64	
RI_8a_2 rev		CTA GAC CCG ACC TCG CCC AGG	69	
RI_8b_1 for	GRMZM2G147226	ATC CAT CCA CCT CAC ACC GCG T	66	
RI_8b_1 rev		AGG CAG CAG GGA TGA CCC TCA	65	
RI_10a_1 for	GRMZM2G106308	AGG GGA AAA CTG CCG GCA AGG	65	
RI_10a_1 rev		GGA CAA CTC GAA AAC CAG GCC AA	65	
RI_10b_1 for	GRMZM2G142088	GAA GCG AAC ACA ACA GCC CCT TC	66	
RI_10b_1 rev		ACC TCC CTG AGC CGG TCC TCT	67	
RI_11b_1 for	GRMZM2G098583	GCC CTC GCA GTC TGC TAC TCT G	68	
RI_11b_1 rev		TGC CAC CAT GCG ATG GTC GT	63	
RI_11b_2 for		TAC CGT CTC CGA CCT CCT CCC T	68	
RI_11b_2 rev		TGC AGC CTG GAA CCG ATT GG	63	
RI_12a_1 for	GRMZM2G140893	GTT CCC GTG CGA TGG CCC AG	67	
RI_12a_1 rev		TCG CAC CAT GGA GTC CCA GCT T	66	
RI_12b_1 for	GRMZM2G000764	AGC ATC AGG CAG CCA AGT GCA	63	
RI_12b_1 rev		TGA CCC AGC CCT CTG GTC GT	65	
RI_12b_2 for		GCC GGC GTC GCC ATA AGC TA	65	
RI_12b_2 rev		GCC ACA TAG CTC AGG CCC AGA	65	
RI_12b_3 for		CAG ATG GGA CGC CG CGT TT	65	

Anhang

RI_12b_3 rev		TGG CAC CTT GCG GTT CCA TGG	65
RI_13_1 for	GRMZM2G108147	CAC AAC ACC ACC AGG CAC CAG C	68
RI_13_1 rev		TGC GAA GCT GTA CGT ACC TTC CAA	65
RI_13_2 for		CCC GTT CAT CCG GTC AGG GG	67
RI_13_2 rev		ATG GGC TGC GTC TTT GCC GT	63
RI_14a_1 for	GRMZM5G871520	GGC CCG TCC TCT GCT AAG CC	67
RI_14a_1 rev		TGA CAT TTG AGG AAC TGA GCC GG	65
RI_15a_1 for	GRMZM2G082836	CGT GAC GCC CAT CGA GTC AAC C	68
RI_15a_1 rev		CGA GCC TGC AGT GTC TCG GT	65
RI_15a_2 for		TCT GAA GCG GCG CGA TCA AGG	65
RI_15a_2 rev		ACC ACA GGA GCA ACC AGC CAA	64
RI_19a_1 for	GRMZM2G063420	ACA TTT TCC AGT CAC TGA CCA GGC	65
RI_19a_1 rev		TAG GGA TCA GTG GAT GAC GTT AGC A	66
RI_19a_2 for		ATG TAC GGC TCC GGA CCG CT	65
RI_19a_2 rev		AGG GAT CAG TGG ATG ACG TTA GCA T	66
RI_19b_1 for	GRMZM2G039622	ATG TAC GGC TCC GGG CCA CT	65
RI_19b_1 rev		ACT CAA CGA AAC ACC CAA CGG TG	65
RI_19b_2 for		TCC TCT TCG CTC CCC CGT GAC	67
RI_19b_2 rev		CCT CAG GGC TAC TTT GGG AAC CT	66
RI_20a_1 for	GRMZM2G158083	GTG CAC CCC GGT TCA GCA CA	65
RI_20a_1 rev		GCA CAA CAC CTG CAG AAA GAT CCA	65
RI_21a_1 for	GRMZM2G396464	GGA ATT GGC AAC ATG CCT CGG T	64
RI_21a_1 rev		GCA CCC CAT CAA ACC CAC TCC A	66
RI_21b_1 for	GRMZM2G371277	ACC TGC GAG GGA GAT TGC TGG A	66
RI_21b_1 rev		CGG TTC TCA ACA TTG CCA AGG GC	66
RI_21b_2 for		AGC GGA CAG CCC CAA GAG GG	67
RI_21b_2 rev		CGT GGT CTC TTC ACC TGC AGT AGC	69
RI_21b_3 for		GGA GTG GGT TTG ATG GGG TGC A	66
RI_21b_3 rev		GCT CCC ACT GCA TCT CCA AGC AC	68
RI_25_1 for	GRMZM2G025459	CGA AAG AGG GCG AGT GGC CA	65
RI_25_1 rev		GCA CGC ATT CAG ACC ACA CAA ACA T	66
RI_25_2 for		GGA CGC ACC TCA ACG GTC GAG	67
RI_25_2 rev		CTG GGA GTG GTG GTC GGT GGA	67
RI_28a_1 for	GRMZM2G117872	ATG GTG TAC CTC CGC CCG CT	65
RI_28a_1 rev		AGG GAC CGG ATG AGG CTG AAC A	66
RI_28a_2 for		TGT TCC TGC GCA AGG GGA CG	65
RI_28a_2 rev		CTC GGA CCT GGC GTG TAG GTT	65
RI_28b_1 for	GRMZM2G042870	TCT CCC TCA GAC GCG CAT CGT	65
RI_28b_1 rev		AGC AGC AAA GCA GGA CAG CCT	63
RI_28b_2 for		CTC CGT ATC CGG TCC GCA AGG	67
RI_28b_2 rev		CAG CCC CGT AGC CGG TCA GT	67
RI_28b_3 for		AAA CCC CAG CCG GAA CAG CGA	65
RI_28b_3 rev		ACG GAC CAT GTG GCG GGA AC	65
RI_29a_1 for	GRMZM2G063643	TGC GCT TGG AAG TTC CCG TCG	65

Anhang

RI_29a_1 rev		AGA ACG GAC GTC CCA CCG TTT	63
RI_29a_2 for		CCG CCG GAA GGA AAA GAG AAA AAC A	66
RI_29a_2 rev		CGA CGG GAA CTT CCA AGC GCA	65
RI_29b_1 for	GRMZM2G472052	ACA GCT GAG GGA ACT GGC TAT GC	66
RI_29b_1 rev		CGG GTG GTG CGC ATC ATC GT	65
RI_29b_2 for		GCT GGG GCC CTT CAT GCA GG	67
RI_29b_2 rev		GGC CCT AGA ATG CGC CCC AC	67
RI_37a_1 for	GRMZM2G113840	GAG GAG CCA AGA CCT CGC GC	67
RI_37a_1 rev		CAG CCG GGG AGG TGG CCT AAA	67
RI_37a_2 for		GGA CGT CCA GGG TGT GGG GT	67
RI_37a_2 rev		TTC CCA GCC GCT TTG AGC GG	65
RI_37a_3 for		GAC GTG CGA AGC TGC CAG CA	65
RI_37a_3 rev		ATC CAG CGA CAA ATC CCA GCA CA	65
RI_37b_1 for	GRMZM2G332495	GCC TCG TGA ATT AGG GAA CGG CT	66
RI_37b_1 rev		GCT GGT GGC AGA GAG TCG CG	67
RI_37b_2 for		CTC TCG CCT CTG CCC TAG CTG	67
RI_37b_2 rev		GTG CAG GCA GGG AAC CTC TCC C	70
RI_37b_3 for		GCA GAT CAC GTC AGT GGA TCG CT	66
RI_37b_3 rev		CTC TCG GCG GCT CTG GAA AGG	67
RI_38b_1 for	GRMZM2G424241	GGG TCC CTC TCG GTC TCG CA	67
RI_38b_1 rev		ACC AGT GGT GTT GCC GTG CC	65
RI_38b_2 for		GGC CCT GGG GAA TGG ATG CC	67
RI_38b_2 rev		TGG GCA GCC AAG ATT GTC GGC	65
RI_38b_3 for		GGT CAT GGG CCA GCA AAC CA	63
RI_38b_3 rev		GCC ATG GGC ATC CAT TCC CCA	65
RI_46a_1 for	GRMZM2G003909	AGC TGA GGC GGC ATT CAA CGG	65
RI_46a_1 rev		TTC TAT TAG TGG GAG CCC TGG CCG	69
RI_46a_2 for		CAG AGC TCG TCT GCA GCC AAA	63
RI_46a_2 rev		CAG GGT CCG TCT CGG GGT TCT	67
RI_46a_3 for		CCG GCC AGG GCT CCC ACT AAT AG	70
RI_46a_3 rev		GGA ACC GAG CGG GCC CAG AAA	67
RI_46b_1 for	GRMZM5G833774	TCG GCA CTA GAA TGT CTG GTC AGT	65
RI_46b_1 rev		TGT TCA ACG ACC ATG TTG ATG GCA	64
RI_47a_1 for	GRMZM2G108309	GAG CCT GGA CTG CAA GGC ACC	67
RI_47a_1 rev		ACC GCG TGG TTT CAG TAG GAG TT	65
RI_47a_2 for		TCC TCC CTC TTC CCT GGT CTG GTC	70
RI_47a_2 rev		TCC GAT GTG CTA AGC GGC CC	65
RI_47b_1 for	GRMZM5G833774	GTA GAG CCC ATC TCT GCG CCC T	68
RI_47b_1 rev		CTT CCC CCT GTG CCC GTC AC	67
RI_47b_2 for		TGG TAG AGC CCA TCT CTG CGC	65
RI_47b_2 rev		CAG CCA GGG AGA GCG ATC CG	67
RI_48a_1 for	GRMZM2G087212	AAC GAT CCC GCG CCC AAT TCC	65
RI_48a_1 rev		ATT TGG GAC GGA GAG GGT ACG T	64
RI_48a_2 for		CCG TAT GAG GCA GCT TGT GCT CG	68

Anhang

RI_48a_2 rev		AAG AGC CGC CAG CTG AGT GC	65
RI_48b_1 for	GRMZM2G026231	AGA TGT GTC ATT TGC ACG CCG TT	63
RI_48b_1 rev		TGC CAA AGG GAA GCA GGC CAC	65
RI_48b_2 for		GGC CTG CTT CCC TTT GGC AGT	65
RI_48b_2 rev		TCC TGT CAT TCT GCT CGG GCG	65
RI_48b_3 for		GGC TCG GGA CCG CGA CAC TC	69
RI_48b_3 rev		GAG CTG CCA ATT GGG TGC CGA T	66
RI_50_1 for	GRMZM2G091819	ACT GGC CGG TCA GCT GTC CT	65
RI_50_1 rev		AGA GCT AGC GGA ACG ACG GTA C	66
RI_50_2 for		TGG TGC AGG TCC ATC AGG CC	65
RI_50_2 rev		TTG TGC CAA CGT CTA GGA CAG CT	65
RI_53a_1 for	GRMZM2G418515	CTT GGC GCA AGC GGG ATC CA	65
RI_53a_1 rev		CAG GAG GCC CCT CGG TTC GA	67
RI_53a_2 for		CAC GTG GGC CTG GGT TCA CA	65
RI_53a_2 rev		AGC TGC TCC CTT GGG ACC GT	65
RI_53b_1 for	GRMZM2G424181	TGA TGG AGC CAT GCC GAC TGC	65
RI_53b_1 rev		TGC ATT GGG CTG GCC TTG GC	65
RI_53b_2 for		TGA TGG AGC CAT GCC GAC TGC	68
RI_53b_2 rev		TGC ATT GGG CTG GCC TTG GC	67
RI_54a_1 for	GRMZM2G145300	CGT TGC CTT GAT GGC CAT TAC CG	66
RI_54a_1 rev		AGC GGC ACT ACG CTT TGC CT	63
RI_54a_2 for		AGA TGC CCT TAA ATG CTG ACA ACC C	66
RI_54a_2 rev		TGT GGG GCA GTC AAG GGC CT	65
RI_54a_3 for		CTA CCC GGT CGG GGG TCG GA	69
RI_54a_3 rev		GCG CCG GCA AAC TTG TTC AAC AT	65
RI_54b_1 for	GRMZM2G012156	AGG CTG TGG CTT TGA AGC GCC A	66
RI_54b_1 rev		CAC GGC GCC TGA AAC TTC GCT	65
RI_54b_2 for		CGG AGG GGC GGA GAA GGT AGA G	70
RI_54a_2 rev		TGG GCA ATG GTT GGT GTG GCA	63
RI_56a_1 for	GRMZM2G178435	TTC CCT GCT TGC CAG CGC AAA	63
RI_56a_1 rev		CGG CCA ATC GCT TGC CTT CCA	65
RI_56b_1 for	GRMZM2G154946	GGA ACC CAG CTG TTG GAA GGC A	66
RI_56b_1 rev		TGA AGC CTG CAG GGT CCT CCC	67
RI_56c_1 for	GRMZM2G453655	TGG CGG TTA CAA GGG AAG GGT G	66
RI_56c_1 rev		GGT GTT TCC AGA CTG TCG GCC A	66
RI_56c_2 for		GGC CGA CAG TCT GGA AAC ACC T	66
RI_56c_2 rev		ACC CTG TTC TCG TGG GAA GCA	63
RI_57_1 for	GRMZM2G091819	AGC ACT GCG AAC ACG TGG CT	63
RI_57_1 rev		ACA AAC ACA GAG CTA GCG GAA CGA C	67
RI_57_2 for		CAT GGA AGG GCG GCA ACG GG	67
RI_57_2 rev		GGA AAC AAA CAC AGA GCT AGC GGA A	66
RI_58a_1 for	GRMZM2G461447	CCA GAA GCC GTG GCA GAG CAT	65
RI_58a_1 rev		CAT GTG TCC ACG GTG TGA GCC C	68
RI_58b_1 for	GRMZM2G339151	GGT GGT GCC TCC GCC AGT CA	67

Anhang

RI_58b_1 rev		AGC ATC AGC TCT GAC ACG GGC T	66
RI_58b_2 for		TTG AAC CCG CCG CTT CGA CTG A	66
RI_58b_2 rev		AGC ACC CCA TTG CCT GCA CT	63
RI_59_1 for	GRMZM2G089163	ACG CTG AGA GCG TGT GTG AGA	63
RI_59_1 rev		TGT GCA TGC GAA CAC AGG CG	63
RI_59_2 for		AGG CAG GCA GCT ACC TCG TGA T	66
RI_59_2 rev		GGT CCC TCC CGG ATG CAG GAA	67
RI_60_1 for	GRMZM2G010085	ATG TGG GCT CGG GAA AGC GT	63
RI_60_1 rev		GCA GGA CCG CAT TGC AGC GA	65
RI_60_2 for		AAG CAC TTC GCC AAG GTG CAC C	66
RI_60_2 rev		GCA CTA CTG CGC GGC AGG GTA	67
RI_61a_1 for	GRMZM2G325679	TAG CAG GCT CAC CTC GAG GAC GAC C	68
RI_61a_1 rev		TGA TTG TCC GCC TTT TGG CAC T	62
RI_61b_1 for	GRMZM2G057743	CCG GCT CCC CGA CCT TTG TAA	65
RI_61b_1 rev		ACC TTG GCA ACG AAG CCG GG	65
RI_61b_2 for		GGC TCC CCG ACC TTT GTA AAC CC	68
RI_61b_2 rev		CCC TGG GCC CAT ACT CGC CA	67
RI_62a_1 for	GRMZM2G007922	GTG GTT CAG CGC CGC CTG AT	65
RI_62a_1 rev		CCC GGC GGA GCA TAA AGG GC	67
RI_62b_1 for	GRMZM2G469162	CCC TTC ATG CTC CGC CGG GT	67
RI_62b_1 rev		AGC AAC AAC CGG GCA ACT GCA	63
RI_63a_1 for	GRMZM2G404571	GGT GGC ATG ATC AGG GAC GG	65
RI_63a_1 rev		AAT GGG TCG GGC GAC TTG TTC C	66
RI_63a_2 for		TGG TGG CAT GAT CAG GGA CGG	65
RI_63a_2 rev		CGC CTT CCG TGA ACC TCA GGG	67
RI_63a_3 for		CCG CGA CAT CGC CAC TGG AA	65
RI_63a_3 rev		GGT CGG GCG ACT TGT TCC CTG	67
RI_63b_1 for	GRMZM2G123063	CGC ATG CGC CCT GAT GAG GT	65
RI_63b_1 rev		GAC AGG CCC CTC ACG GGC TA	67
RI_63b_2 for		CGC CAC CGT GGG GAG GAA TG	67
RI_63b_2 rev		GGC CCA TTT GTG TTG GGC GC	65

12.2 verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Puffer für die SMART®-cDNA Herstellung:

Wasch A-Puffer: 10 mM Tris-HCL; pH 7,5

0,15 M LiCl

1 mM EDTA

Anhang

5x Erststrang-Puffer: 250 mM Tris-HCL; pH 8,3
375 mM KCL
30 mM MgCl₂

Lysis- Binding-Puffer: 100 mM Tris-HCL; pH 7,5
500 mM LiCl
10 mM EDTA; pH 8,0
1% Lithium-Dodecylsulfat
5 mM Dithiothreitol (DTT)

Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien:

Antibiotika-Stammlösung: Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) , sterilfiltrieren
Endkonzentration im Medium 50 µg/ml

LB-Medium: 10 g/l Pepton aus Casein
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
pH 7,0-7,2
Festmedium: Zugabe von 15 g/l Bacto Agar
autoklavieren

SOB-Medium: 20 g Bacto-Trypton

Anhang

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

2,5 ml 1M KCL

pH auf 7,0 mit 10 M NaOH einstellen

autoklavieren

SOC-Medium: 20 ml 1M Glucose (steril) zum SOB-Medium hinzufügen

IPTG/X-Gal-Platten: 20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) in Dimethylformamid

0,1 M Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG), sterilfiltriert

Endkonzentration in LB-Platten: IPTG 0,2 mM; X- Gal 40 μ g/ml

Standardpuffer und -lösungen:

Natrium-Acetat: 3 M Natrium-Acetat; pH 5,2

autoklavieren

10x TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl; pH 8,0

1 mM EDTA; pH 8,0

10x TBE-Puffer: 89 mM Tris Base

Anhang

89 mM Borsäure

2 mM Na₂EDTA; pH 8,0

autoklavieren

50x TAE-Puffer:

2 M Tris Base

1 M Essigsäure

50 mM Na₂EDTA; pH 8,0

autoklavieren;

EDTA:

0,5 M Na₂EDTA·2H₂O; pH 8,0

autoklavieren

Mannit (600mOsm):

109,32 g/l Mannit

autoklavieren

10mM dNTPs:

10 µl 100mM dATP

10 µl 100mM dTTP

10 µl 100mM dCTP

10 µl 100 mM dGTP

mit ddH₂O auf 100 µl auffüllen

Lösungen für Arbeiten mit RNA:

Anhang

RNA-Extraktionspuffer:	200 mM NaCl
	50 mM Tris; pH 8,8-9,0
	5 mM EDTA; pH 8
	sterilfiltrieren
	1% SDS
MOPS-Puffer:	200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
RNA 5x Ladepuffer:	16 µl gesättigtes Bromphenolblau
	80 µl EDTA 500mM
	100 µl EtBr 10mg/ml
	720 µl 37% Formaldehyd
	2 ml Glycerol
	3,084 ml Formamid
	4 ml 10x MOPS
	mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen
MOPS-Laufpuffer:	50 ml 10x MOPS-Puffer
	10 ml 37% Formaldehyd
	auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen

Anhang

Lösungen für Arbeiten mit DNA:

Waite Puffer: 100 mM Tris HCL; pH 8,5
100 mM NaCl,
10 mM EDTA
30% N-Laurin-Sarcosin

Lösungen für Arbeiten mit Agrobakterien:

AB-Puffer (20x): 60 g/L K_2HPO_4
20 g/L NaH_2PO_4
auf pH 7 einstellen und sterilfiltrieren

AB-Salz (20x): 20 g/L NH_4Cl
6 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
3 g/L KCL
50 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
autoklavieren

AB-Medium: 10 ml AB-Puffer (20x)
10 ml AB-Salze (20x)
100 ml 100mM Glukose
80 ml ddH₂O

Anhang

Selektions AB-Medium:	30 ml AB-Medium
	30 µl Spectinomycin (100mg/ml)
	120 µl Rifampicin (25mg/ml)
	3 µl Acetosyringon (1M/L)
Basta:	5 mg/l
N6 osm Platten:	250 ml N6 osm 2x
	250 ml Phytigel
	1000 µl 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (0,5mg/ml)
N6 + 2,4D Platten:	250 ml N6 osm 2x
	250 ml Phytigel
	500 µl 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (0,5mg/ml)

12.3 *DNG105* RNAi-Sequenz

CGAAGTTTCCTAAGAGTGAGAGACACTGTCAAGATAATGCGACTCAATTAATAGATGG
TGTCGATAGAAAAATGAAGTCAAAGAAGCATTGATAACTTTGACTTGGTTCATTCA
CATTTTGATGAATACATTAAATCTGAGGAAGAAGTTGACTTTGATAAAAAGGTGAAAA
GTCAATACGGCGAAGACTACAATAGAATTATAGGAAATTTTGCTGCAAGTATGAAGCA
GAAAAACATCTCTACTTGGGACAGTGATCTTATGAATTTAGTGAAAGATAAATATGGA
AATCCAGTGT

Anhang

12.4 Zusammenfassung der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken Kreuzungen mit der transgenen Maislinie *dng105*

Tabelle 10: Tabellarische Zusammenfassung der allelspezifischen Expressionsanalysen der reziproken Kreuzungen mit der transgenen Maislinie *dng105* für die imprinteten Gene *MEE1*, *FIE1*, GRMZM2G091819 und GRMZM2G472052.

kein Einfluss (k.E.) auf die allelspezifische Expression, nicht analysiert (n.a.)

durchgeführte Kreuzung	MEE1 (MEG)	FIE1 (MEG)	GRMZM2GG091819 (PEG)	GRMZM2GG472052 (PEG)
Mo17 x 270/2/1	k.E.	k.E.	n.a.	n.a.
207/2/1 x xMo17	k.E.	Aufhebung des Imprintings	n.a.	n.a.
Mo17 x 265/7/1	k.E.	k.E.	n.a.	n.a.
267/7/1 x Mo17	k.E.	Aktivierung des paternalen Allels	n.a.	n.a.
B73 x 270/5/3	k.E.	k.E.	Aufhebung des Imprintings	n.a.
270/5/3 x B73	k.E.	k.E.	k.E.	n.a.
B73 x 267/14/1	k.E.	k.E.	Aktivierung des maternalen Allels	Aktivierung des maternalen Allels
267/14/1 x B73	k.E.	Aufhebung des Imprintings, Aktivierung des paternalen Allels	k.E.	k.E.
B73 x 264/2/4	k.E.	k.E.	Aufhebung des Imprintings	n.a.
B73 x 264/2/5	k.E.	k.E.	Aktivierung des maternalen Allels	n.a.

12.5 Transkript- und Oligonukleotidanalyse zur Identifikation imprinteter Gene im Maisembryo

Tabelle 11: Zusammenfassung der Transkript- und Oligonukleotidanalyse zur Identifikation imprinteter Gene im Maisembryo

Primer-Bezeichnung	Mais-Identifikationsnummer	Transkriptlänge (bp)	Größe der amplifizierten Produkte (bp)	Primerposition auf dem Transkript	untersuchte Produktgröße, abzüglich Überschneidungen (bp)
EMBI 1_1	AC211403.4_FG005	1068	627	279-905	963
EMBI 1_2			457	606-1062	
EMBI 1_3			718	99-816	
EMBI 2_1	GRMZM2G028366	3238	825	1920-2744	1008
EMBI 2_2			860	2069-2928	
EMBI 3_1	GRMZM2G093947	1098	616	191-806	723
EMBI 3_2			315	600-914	
EMBI 3_3			620	242-861	
EMBI 5_1	GRMZM2G365731	2624	704	1701-2404	1689

Anhang

EMBI 5_2			985	132-1116	
EMBI 6_1	GRMZM2G014119	1051	892	55-946	932
EMBI 6_2			379	14-392	
EMBI 7_1	GRMZM2G014256	1029	412	618-1029	856
EMBI 7_2			656	173-828	
EMBI 8_1	GRMZM2G118205	1948	650	1171-1820	682
EMBI 8_2			521	1333-1853	
EMBI 9_1	GRMZM2G130580	1304	463	129-591	463
EMBI 10_1	GRMZM2G136364	1181	591	24-614	953
EMBI 10_2			899	14-912	
EMBI 10_3			944	24-967	
EMBI 11_1	GRMZM2G354579	1491	555	49-603	973
EMBI 11_2			957	66-1022	
EMBI 11_3			427	534-960	
EMBI 12_1	GRMZM2G370991	2534	862	1401-2262	1110
EMBI 12_2			291	2221-2511	
EMBI 14_1	GRMZM2G083932	1300	849	400-1248	1167
EMBI 14_2			404	81-484	

12.6 Polymorphismus bzw. Doppelpeak-Position der untersuchten Gene im Maisembryo

Gen: GRMZM2G093947

Doppelpeak-Position: 753

Gen: GRMZM2G014119

Polymorphismus-Position: 677

Doppelpeak-Position: 282, 295, 303, 326, 333, 427, 444, 448, 482, 597, 626

12.7 Expressionslevel des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Maisgeweben

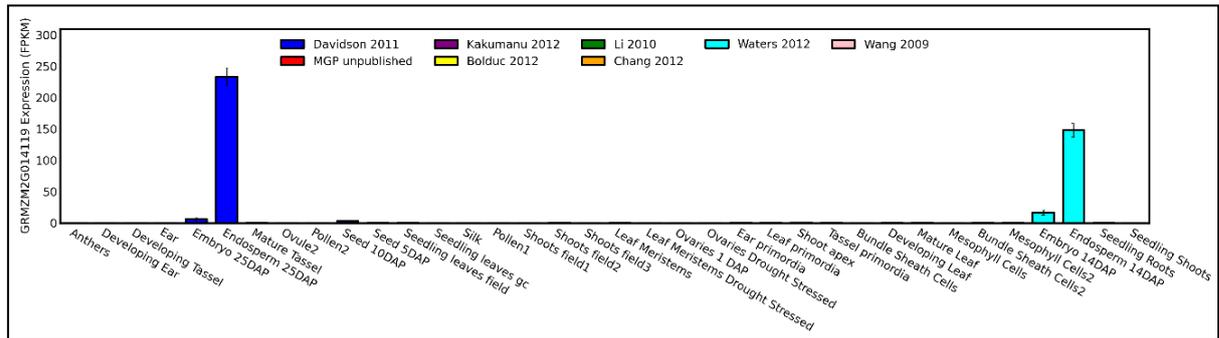


Abbildung 32: Detektierte Expressionslevel des Gens GRMZM2G014119 in verschiedenen Maisgeweben.

Das über qTeller (<http://qteller.com/>) verfügbare Histogramm zeigt die für das Gen GRMZM2G014119 ermittelten Expressionsdaten aus RNA-Tiefensequenzierungen unterschiedlicher Veröffentlichungen. Die Expression für das Gen konnte im Embryo und Endosperm (14, 25 dap) sowie im Samen (10 dap) detektiert werden (Davidson *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2011).

12.8 Expressionsanalysen im Endosperm der transgenen *mee1_{Pro}:mee1:GFP* Maispflanzen

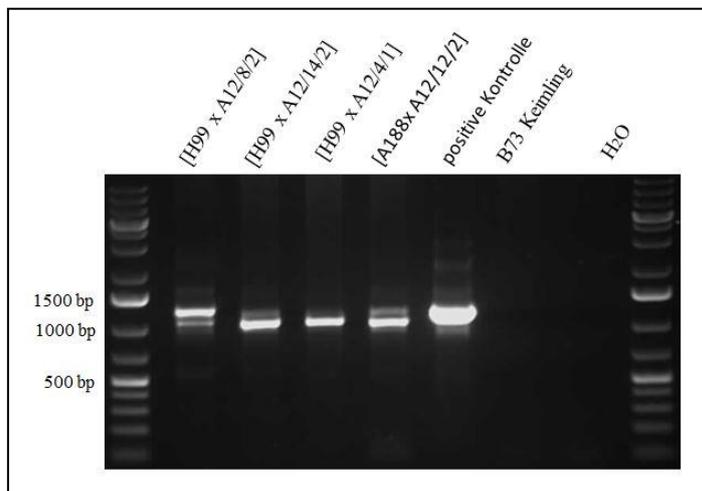


Abbildung 33: Nachweis der *mee1:GFP* Expression im Endosperm der *mee1_{Pro}:mee1:GFP* Maispflanze (*embryo rescue*, F2-Generation).

Die mittels *embryo rescue* erzeugten Nachkommen [H99 x A12/8/2], [H99 x A12/14/2], [H99 x A12/4/1] und [A188 x A12/12/2] der transgenen *mee1*-Prom.:*mee1:GFP* Regenerate, wurden geselbstet und im Anschluss das 7 dap Endosperm isoliert. Zum Nachweis der *mee1:GFP* Expression im Endosperm, wurde die cDNA als Template in der PCR mit den Oligonukleotiden MEE1-Afl for und MEE1-GFP rev verwendet. Zur Kontrolle der PCR wurde das Plasmid pBlue *mee1*-Prom.:*mee1:GFP* als positive Kontrolle und B73 Keimling cDNA sowie Wasser als negative Kontrolle mitgeführt. Als Größenstandart wurde der 1 kb Plus Marker von Fermentas auf das 1,5% TAE-Agarosegel aufgetragen. Bei der *mee1:GFP* Amplifikation von cDNA wird ein 1033 bp großes und bei gDNA ein 1222 bp großes PCR-Produkt erwartet.

12.9 Nachweis über die Verwendung von cDNA-Proben in den durchgeführten Expressionsanalysen

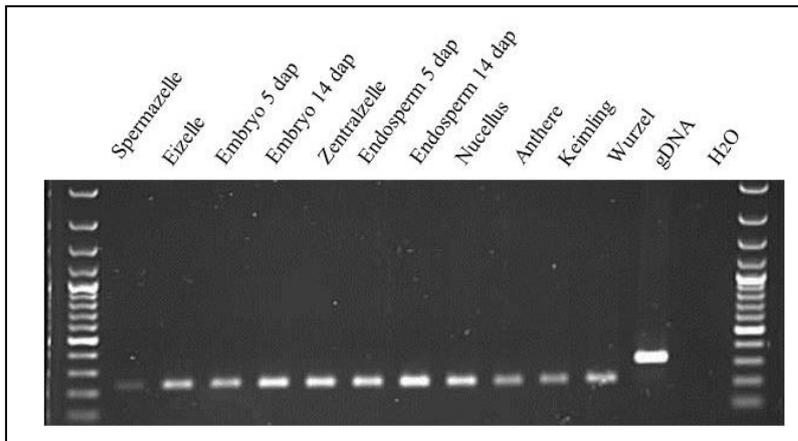


Abbildung 34: Aktin-PCR der verwendeten cDNA-Proben in den Expressionsanalysen

Aktinnachweis über RT-PCR mit den Proben, die für die Expressionsanalysen der imprinteten Gene verwendet wurden. Zur Überprüfung, dass in den Analysen ausschließlich cDNA verwendet wurde. Als negative Kontrolle wurde in der PCR Wasser mitgeführt. Aufgrund eines Introns im Aktin (Primer Aktin Ex 2 for und Aktin Ex3 rev) ist das PCR-Produkt, welches aus gDNA amplifiziert wurde größer als das der cDNA

12.10 Imprinting der syntenisch orthologen Gene zwischen Reis und Mais

Tabelle 12: Zusammenfassung der syntenisch orthologen Gene in Reis und Mais.

Reis Gen	Reis imp. Expression	Gen-Annotation	Mais Gen	Mais Chr	Mais imp. Expression	Expression	
						Mais ^f	Reis
Os01g42270.1	MEG	transkriptioneller Korepressor LEUNIG	GRMZM2G361398	Chr3	MEG ^c	a	EN-S
Os01g54784.1	PEG	exprimiertes Protein	GRMZM2G042099	Chr3	NIG	a	a
Os01g63250.1	PEG	Josephin	GRMZM5G897988	Chr8	PEG ^c	a	kD
			GRMZM2G148115	Chr3	PEG	a	
Os02g39920.1	PEG	AT Hook Motiv-Proteinfamilie	GRMZM2G106308	Chr4	NIG	kD	a
Os02g51860.1	PEG	Dehydration Antwort verwandtes Protein, putativ	GRMZM2G140893	Chr5	NIG	a	a
Os02g57080.1	PEG ^a	Serin/ Threonin-Proteinkinase	GRMZM5G871520	Chr5	PEG ^c	a	a
Os04g39560.1	MEG	exprimiertes Protein	GRMZM2G063420	Chr7	NIG	a	a
Os04g42250.2	PEG	transferase family protein, putative	GRMZM2G158083	Chr2	NIG	a	a
Os05g26040.1	MEG	Pumilio-Familie RNA bindungs-enthaltendes Protein	GRMZM2G396464	Chr1	NIG	kD	EN-S
			GRMZM2G371277	Chr10	NIG	a	
Os07g12490.1	PEG	KH Domäne enthaltendes Protein	GRMZM2G472052	Chr7	PEG ^{c,d,e}	a	a

Anhang

Os08g38850.1	MEG	Phosphatidylinositol Übertragung	GRMZM2G113840	Chr1	NIG	a	a
			GRMZM2G332495	Chr4	MEG ^c	a	
Os11g07910.1	PEG	Transmembrandomäne 9 Superfamilie	GRMZM2G026231	Chr10	PEG ^c	a	a
Os12g08780.1	PEG ^a	YUCCA10 ähnliche, Flavin-Monooxygenase	GRMZM2G091819	Chr10	PEG ^{c,d,e}	EN-B	EN-S
Os12g37860.1	PEG	MOS1 Modifizierer nach sncl	GRMZM2G418515	Chr3	NIG	a	a
Os12g40520.1	PEG	MATH Domäne enthaltendes Protein	GRMZM2G145300	Chr3	MEG ^c	a	a
Os02g43460.1	MEG ^{a,b}	erforderlich zur Repressions Aufrechterhaltung1, putativ	GRMZM2G178435	Chr4	MEG	EN-B	kD
			GRMZM2G453655	Chr6	NIG	a	
Os04g22240.1	PEG ^{a,b}	Zink-Finger Protein, C3HC4 Typ Domäne, VIM5	GRMZM2G339151	Chr8	NIG	kD	kD
Os03g22900.1	MEG ^{a,b}	SnF2 Familie Protein N-terminale Domäne	GRMZM2G469162	Chr1	NIG	a	kD

a Diese *Oryza sativa* Gene verfügen über imprintete Homologe in Arabidopsis (Luo *et al.*, 2011)

b Imprintete Expression aus den RNA-Seq Daten entnommen (Luo *et al.*, 2011)

c Gene mit Polymorphismen zwischen den Inzuchtlinien B73 und Mo17 (Waters *et al.*, 2011)

d Imprinted in 10dap Maisendosperm (Zhang *et al.*, 2011)

e Signifikante paternale voreingenommene Expression in 14dap Maisendosperm (Waters *et al.*, 2011)

f Expressions Eingruppierung auf der Grundlage des Mais Expressions Atlas (Sekhon *et al.*, 2011)

g Eingruppierung der Expression Luo *et al.* (Luo *et al.*, 2011)

12.11 Paraloge Gene der nicht imprinteten Gene in Mais

Tabelle 13: Paraloge Gene der nicht imprinteten Gene (NIGs) in Mais in 10 dap (Zhang *et al.*, 2011) und 14 dap (Waters *et al.*, 2011) Maisgewebe.

identifizierte NIG in Mais	Paraloge in Mais	Zhang <i>et al.</i> , 2011; Gen als imprintet identifiziert	Waters <i>et al.</i> , 2011; Polymorphismen ermittelt / Gen als imprintet identifiziert	
GRMZM2G042099	GRMZM2G042099	nein	ja	nein
	0	/	/	/
GRMZM2G106308	GRMZM2G106308	nein	ja	nein
	GRMZM2G142088	nein	ja	nein
	GRMZM5G833276	nein	nein	nein
	GRMZM2G028910	nein	nein	nein
	GRMZM5G876132	nein	nein	nein
	GRMZM2G000245	nein	ja	nein
	GRMZM2G041876	nein	ja	nein
	GRMZM2G010637	nein	ja	nein
	AC208838.3_FG002	nein	nein	nein
GRMZM2G368678	nein	ja	nein	

Anhang

	GRMZM2G087619	nein	nein	nein
GRMZM2G140893	GRMZM2G140893	nein	nein	nein
	GRMZM5G824698	nein	nein	nein
	GRMZM2G000764	nein	ja	nein
	GRMZM2G067764	nein	nein	nein
	GRMZM2G015126	nein	ja	nein
	GRMZM2G107629	nein	ja	nein
	GRMZM2G433989	nein	nein	nein
	GRMZM2G575696	nein	nein	nein
	GRMZM2G431963	nein	nein	nein
	GRMZM2G106892	nein	nein	nein
GRMZM2G063420	GRMZM2G063420	nein	nein	nein
	GRMZM2G039622	nein	ja	nein
GRMZM2G158083	GRMZM2G158083	nein	ja	nein
	GRMZM2G035584	nein	ja	nein
	GRMZM2G131165	nein	ja	nein
	GRMZM2G051005	nein	ja	nein
	GRMZM2G156296	nein	ja	nein
	GRMZM2G089698	nein	nein	nein
	GRMZM2G160400	nein	nein	nein
	GRMZM5G878365	nein	nein	nein
	GRMZM2G178769	nein	nein	nein
	GRMZM2G107211	nein	nein	nein
	GRMZM2G127251	nein	nein	nein
	GRMZM2G177349	nein	ja	nein
	GRMZM2G132678	nein	nein	nein
	GRMZM2G176446	nein	nein	nein
	GRMZM2G156816	nein	ja	nein
	AC215260.3_FG003	nein	nein	nein
	GRMZM2G302002	nein	nein	nein
GRMZM2G129403	nein	nein	nein	
GRMZM2G396464	GRMZM2G396464	nein	ja	nein
	GRMZM2G363338	nein	nein	nein
	GRMZM2G327175	nein	nein	nein
	GRMZM2G304586	nein	nein	nein
	GRMZM2G391491	nein	nein	nein
	GRMZM2G371277	nein	nein	nein
	GRMZM2G097493	nein	nein	nein
	GRMZM2G169757	nein	nein	nein
	GRMZM2G138848	nein	nein	nein
	GRMZM2G480122	nein	nein	nein
	GRMZM2G478401	nein	nein	nein
	GRMZM2G389045	nein	nein	nein
GRMZM2G325543	nein	nein	nein	

Anhang

	GRMZM5G894275	nein	nein	nein
	GRMZM2G362557	nein	nein	nein
	GRMZM2G130326	nein	nein	nein
	GRMZM2G370848	nein	nein	nein
	GRMZM2G148817	nein	nein	nein
	GRMZM2G317552	nein	nein	nein
	GRMZM2G471283	nein	nein	nein
	GRMZM2G448277	nein	nein	nein
	GRMZM2G304797	nein	nein	nein
	GRMZM2G405580	nein	nein	nein
	GRMZM2G429226	nein	nein	nein
	GRMZM2G467391	nein	nein	nein
	GRMZM2G464103	nein	nein	nein
	GRMZM2G315707	nein	nein	nein
	GRMZM2G469130	nein	nein	nein
	GRMZM2G506830	nein	nein	nein
	GRMZM2G333405	nein	nein	nein
	GRMZM2G333536	nein	nein	nein
	EF517601.1_FG001	nein	nein	nein
	GRMZM2G131536	nein	nein	nein
	GRMZM2G389289	nein	nein	nein
	GRMZM2G105342	nein	nein	nein
	GRMZM2G411221	nein	nein	nein
	GRMZM2G472156	nein	nein	nein
	GRMZM2G382353	nein	nein	nein
	GRMZM2G406129	nein	nein	nein
	GRMZM2G472719	nein	nein	nein
	GRMZM2G320204	nein	nein	nein
	GRMZM2G480349	nein	nein	nein
	GRMZM5G847787	nein	nein	nein
	GRMZM2G128778	nein	nein	nein
	GRMZM2G435473	nein	nein	nein
	GRMZM2G437857	nein	nein	nein
	GRMZM2G322451	nein	nein	nein
	GRMZM2G319256	nein	nein	nein
	GRMZM2G351210	nein	nein	nein
	GRMZM2G344856	nein	nein	nein
	GRMZM2G073164	nein	nein	nein
	GRMZM2G454472	nein	nein	nein
	GRMZM2G316089	nein	nein	nein
GRMZM2G371277	GRMZM2G371277	nein	nein	nein
	GRMZM2G396464	nein	nein	nein
	GRMZM2G363338	nein	nein	nein
	GRMZM2G327175	nein	nein	nein

Anhang

GRMZM2G169757	nein	nein	nein
GRMZM2G304586	nein	nein	nein
GRMZM2G391491	nein	nein	nein
GRMZM2G097493	nein	nein	nein
GRMZM2G138848	nein	nein	nein
GRMZM2G480122	nein	nein	nein
GRMZM2G478401	nein	nein	nein
GRMZM2G389045	nein	nein	nein
GRMZM2G325543	nein	nein	nein
GRMZM5G894275	nein	nein	nein
GRMZM2G362557	nein	nein	nein
GRMZM2G130326	nein	nein	nein
GRMZM2G370848	nein	nein	nein
GRMZM2G148817	nein	nein	nein
GRMZM2G317552	nein	nein	nein
GRMZM2G471283	nein	nein	nein
GRMZM2G448277	nein	nein	nein
GRMZM2G304797	nein	nein	nein
GRMZM2G405580	nein	nein	nein
GRMZM2G429226	nein	nein	nein
GRMZM2G467391	nein	nein	nein
GRMZM2G464103	nein	nein	nein
GRMZM2G315707	nein	nein	nein
GRMZM2G469130	nein	nein	nein
GRMZM2G506830	nein	nein	nein
GRMZM2G333405	nein	nein	nein
GRMZM2G333536	nein	nein	nein
EF517601.1_FG001	nein	nein	nein
GRMZM2G131536	nein	nein	nein
GRMZM2G389289	nein	nein	nein
GRMZM2G105342	nein	nein	nein
GRMZM2G411221	nein	nein	nein
GRMZM2G472156	nein	nein	nein
GRMZM2G382353	nein	nein	nein
GRMZM2G406129	nein	nein	nein
GRMZM2G472719	nein	nein	nein
GRMZM2G320204	nein	nein	nein
GRMZM2G480349	nein	nein	nein
GRMZM5G847787	nein	nein	nein
GRMZM2G128778	nein	nein	nein
GRMZM2G435473	nein	nein	nein
GRMZM2G437857	nein	nein	nein
GRMZM2G322451	nein	nein	nein
GRMZM2G319256	nein	nein	nein

Anhang

	GRMZM2G351210	nein	nein	nein
	GRMZM2G344856	nein	nein	nein
	GRMZM2G073164	nein	nein	nein
	GRMZM2G454472	nein	nein	nein
	GRMZM2G316089	nein	nein	nein
GRMZM2G113840	GRMZM2G113840	nein	ja	nein
	GRMZM2G332495	nein	ja	nein
	GRMZM2G031837	nein	ja	nein
	GRMZM2G318737	nein	nein	nein
	GRMZM2G312198	nein	nein	nein
	GRMZM2G353259	nein	nein	nein
	GRMZM2G010834	nein	ja	nein
	GRMZM2G452580	nein	ja	nein
	GRMZM5G842306	nein	nein	nein
	GRMZM2G459982	nein	nein	nein
	GRMZM2G014994	nein	nein	nein
	GRMZM5G807780	nein	nein	nein
	GRMZM5G834778	nein	nein	nein
	GRMZM5G860178	nein	nein	nein
	GRMZM2G171354	nein	nein	nein
	GRMZM2G055542	nein	nein	nein
	GRMZM2G073571	nein	ja	nein
	GRMZM2G162461	nein	nein	nein
	GRMZM2G355610	nein	nein	nein
	GRMZM2G174990	nein	ja	nein
	GRMZM2G157043	nein	nein	nein
	GRMZM2G171349	nein	ja	nein
	GRMZM2G087433	nein	nein	nein
GRMZM2G434445	nein	ja	nein	
AC215994.3_FG003	nein	ja	nein	
GRMZM2G418515	GRMZM2G418515	nein	ja	nein
	GRMZM2G424181	nein	ja	nein
GRMZM2G453655	GRMZM2G453655	nein	nein	nein
	0	/	/	/
GRMZM2G339151	GRMZM2G339151	nein	ja	nein
	GRMZM2G461447	nein	nein	nein
	AC191534.3_FG003	ja (PEG)	ja	PEG
GRMZM2G469162	GRMZM2G469162	nein	ja	nein
	GRMZM2G007922	nein	ja	nein

12.12 Chromatogramme der allelspezifischen Expressionsanalysen der syntenisch orthologen Gene im Maisendosperm

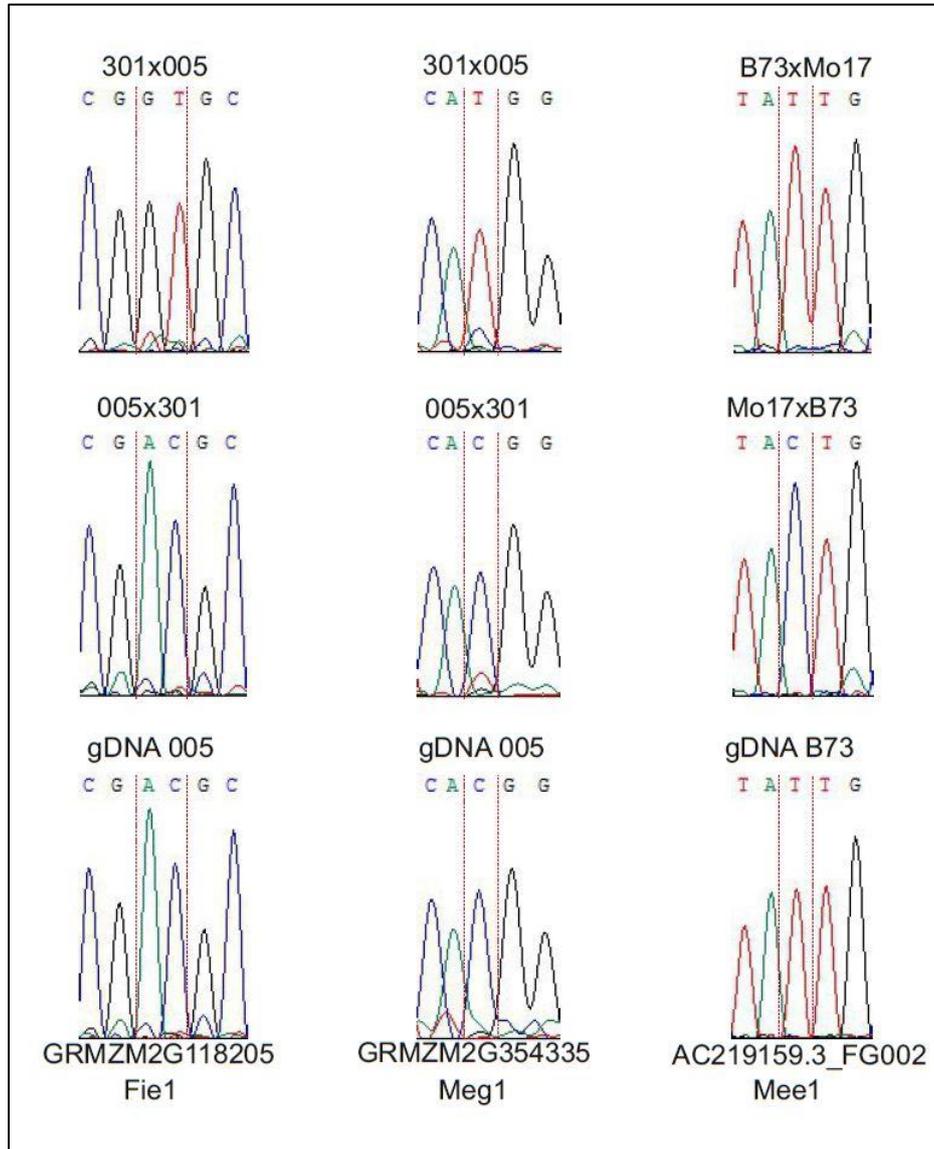


Abbildung 35: Chromatogramme der bekannten imprinteter Gene *FIE1*, *MEG1* und *MEE1* in Maisendosperm zur Kontrolle.

Die Chromatogramme der reziproken Kreuzungen und Inzuchtlinien eines Gens sind jeweils untereinander angeordnet. Der untersuchte Polymorphismus ist grafisch hervorgehoben.

Anhang

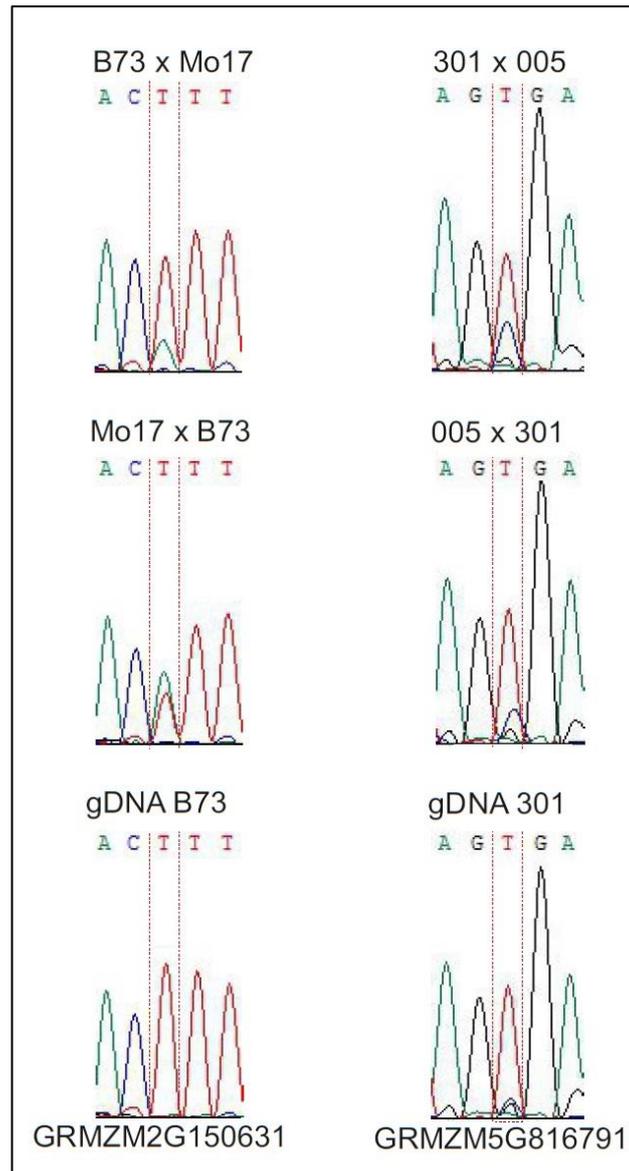


Abbildung 36: Chromatogramme nicht imprinteter Gene in Maisendosperm zur Kontrolle.

Die Chromatogramme der reziproken Kreuzungen und Inzuchtlinien eines Gens sind jeweils untereinander angeordnet.

Der untersuchte Polymorphismus ist grafisch hervorgehoben.

Anhang

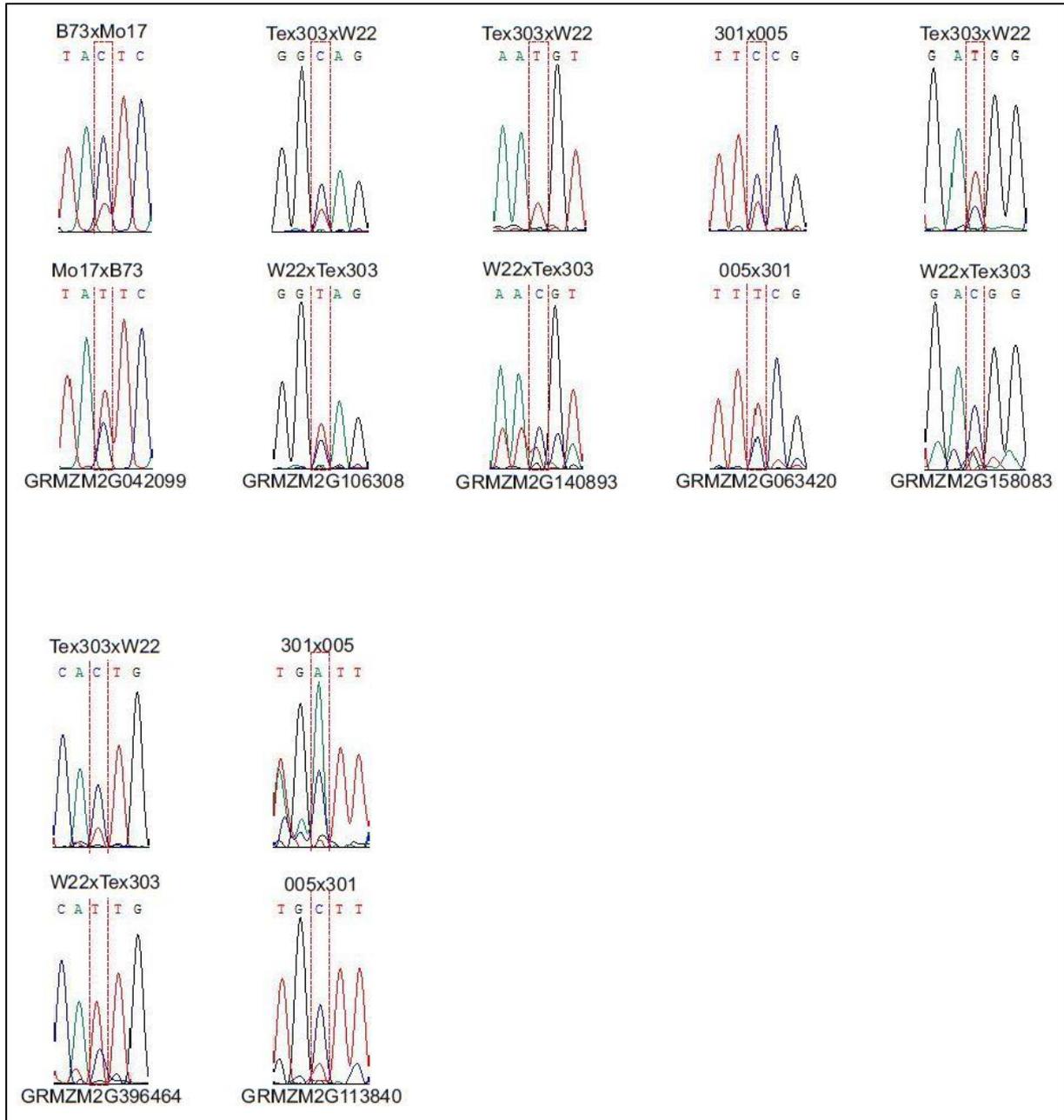


Abbildung 37: Chromatogramme nicht imprinteter Gene.

Die Chromatogramme der reziproken Kreuzungen der nicht imprinteten Gene sind jeweils untereinander angeordnet. Die Gene konnten in einer Genotypkombination nachgewiesen werden. Der untersuchte Polymorphismus ist grafisch hervorgehoben.

Anhang

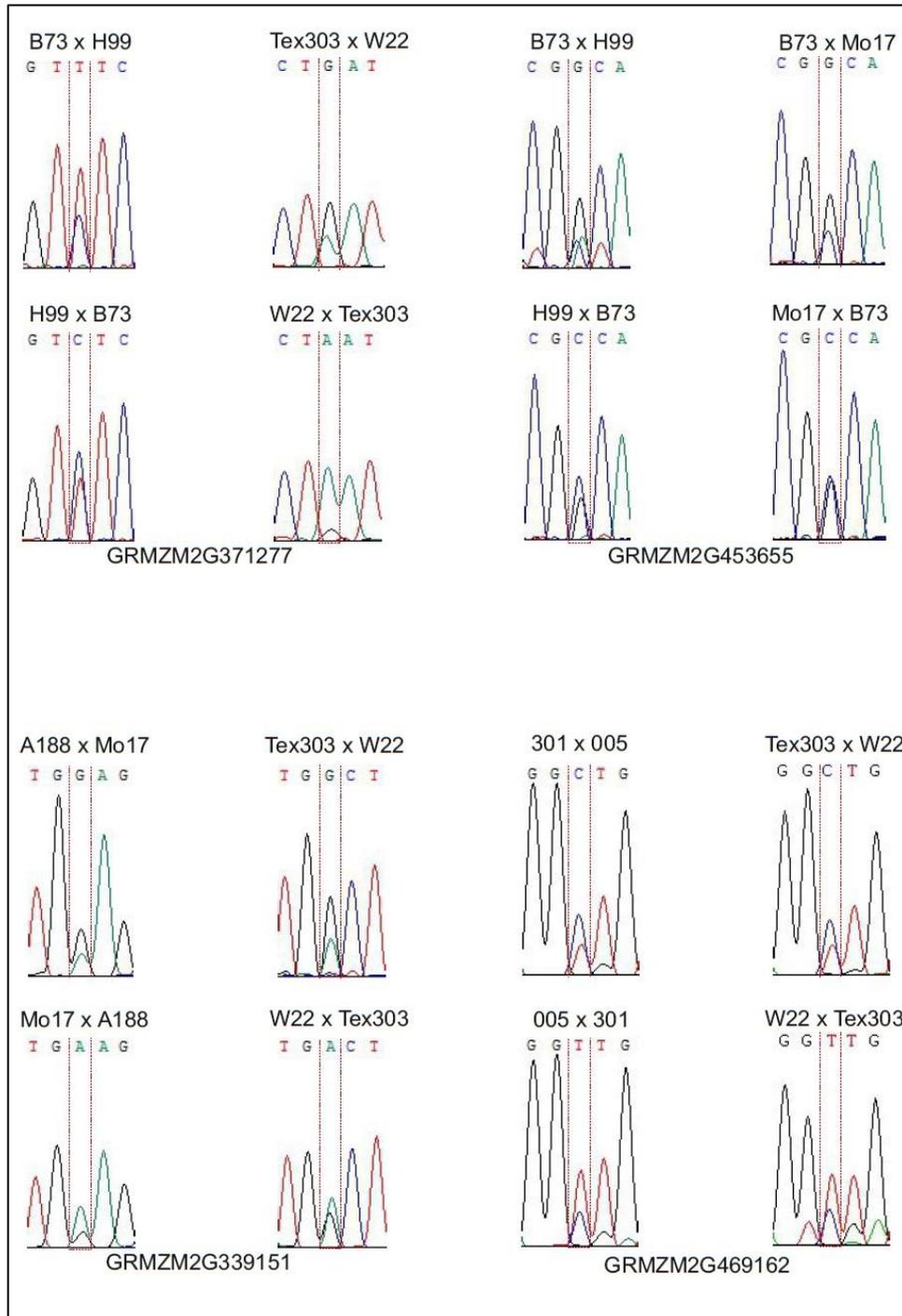


Abbildung 38: Chromatogramme nicht imprinteter Gene, die in zwei unterschiedlichen Genotypkombinationen nachgewiesen wurden.

Die Chromatogramme der reziproken Kreuzungen der nicht imprinteten Gene sind jeweils untereinander und die beiden Genotypkombinationen nebeneinander angeordnet. Der untersuchte Polymorphismus ist grafisch hervorgehoben.

Anhang

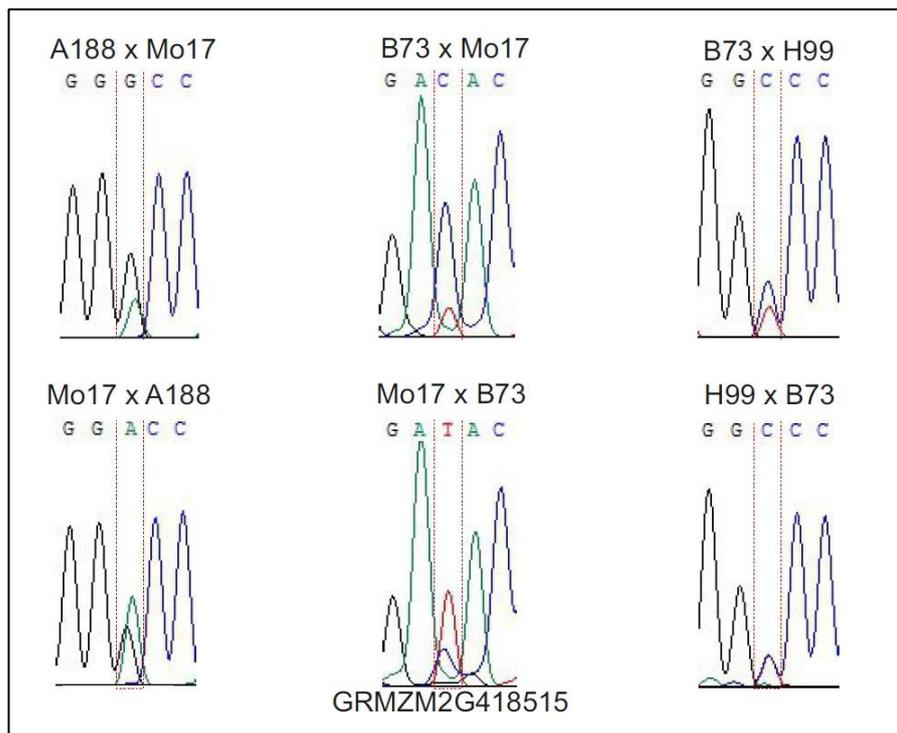


Abbildung 39: Chromatogramme eines nicht imprinteten Gens, das in drei unterschiedlichen Genotypkombinationen nachgewiesen wurde.

Die Chromatogramme der reziproken Kreuzungen des nicht imprinteten Gens sind jeweils untereinander und die drei Genotypkombinationen nebeneinander angeordnet. Der untersuchte Polymorphismus ist grafisch hervorgehoben.

Anhang

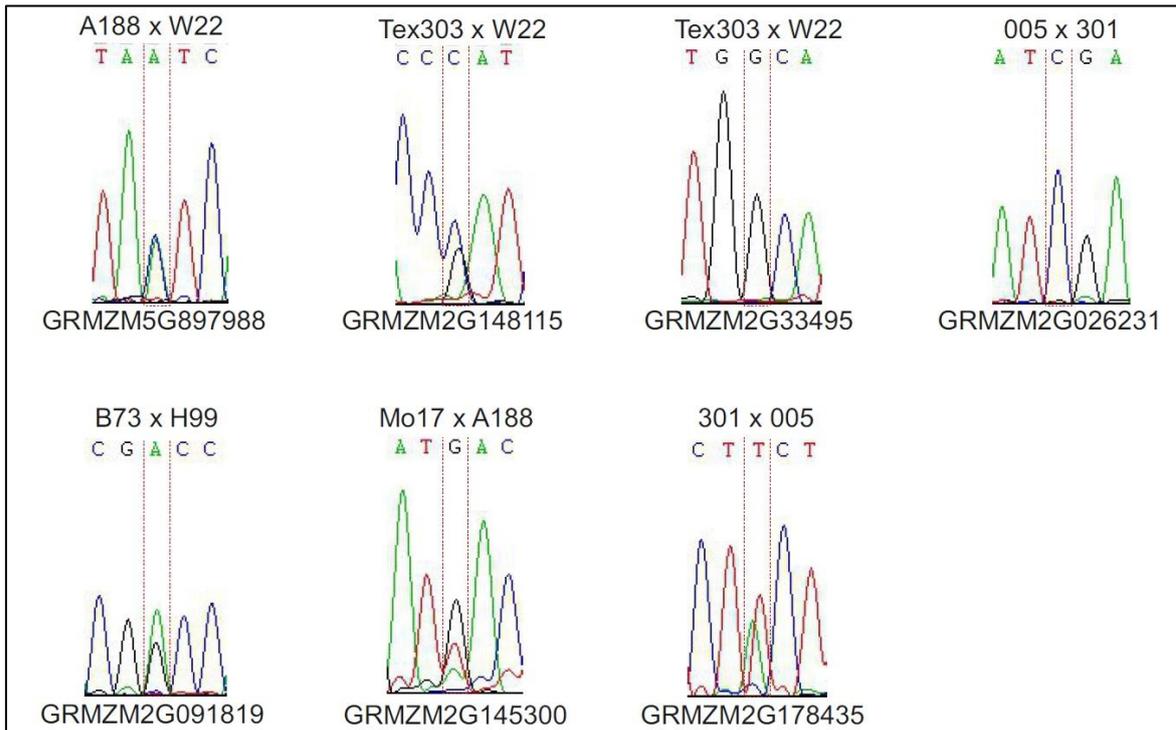


Abbildung 40: Chromatogramme aus Proben mit einem übereinstimmenden Mischungsverhältnis.

Zur Verifizierung der Methode wurden allelische Expressionsmuster der imprinteten Maisgene mit einem übereinstimmenden Mengenverhältnis von genomischer DNA zwei verschiedener Genotypen analysiert. Die untersuchten Nukleotide sind grafisch hervorgehoben.

12.13 Gespeicherte Daten auf der beiliegenden CD

Daten zum syntenischen Imprinting im Maisendosperm (z.B. syntenische Reisgene, Primerdaten, Polymorphismenposition).

Hemimethylierungsanalysen für das Gen *MEE1*:

%-Methylierungswert der CG-, CHG- und CHH-Kontexte für den Plus- und Minus-Strang

p-value t-Test-Endosperm und Embryo

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Stefan Scholten für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und für die geduldige und kompetente Betreuung danken.

Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz danke ich, für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dominika Rybka und Sabina Miaskowska für ihre große Hilfe im Labor und im Gewächshaus.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Alexander Thiemann und Felix Seifert für die hilfreichen Diskussionen bedanken.

Ich möchte allen meinen Kollegen im Institut für die schönen Stunden und lustigen Betriebsausflüge danken.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die Zeit bedanken, in denen sie mich auf andere Gedanken gebracht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Nicole und meinem Freund Karsten, die immer für mich da waren und an mich geglaubt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei der Universität Hamburg für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Nadine Petersen, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, den 11. Juli 2013

Nadine Petersen

Mit der Veröffentlichung meiner Dissertation bin ich einverstanden.

Hamburg, den 11. Juli 2013

Nadine Petersen