

1 Einleitung

Die Entdeckung und Etablierung von Methoden zur Übertragung von Erbmaterial auf Pflanzen hat einigen Wissenschafts- und Wirtschaftsgebieten zuvor ungeahnte Möglichkeiten eröffnet. Voraussetzung für den Einsatz transgener Pflanzen in Wissenschaft und Praxis ist eine über viele Generationen stabile und starke Expression des Transgens. In vielen Fällen wurden jedoch bei Untersuchungen zur Expression und Vererbung von Transgenen Abweichungen von dem zu erwartenden Erbgang beobachtet (Deroles und Gardner 1988). Neben Transformanten, die einen vollständigen Verlust der Expression zeigten, wurden Pflanzen mit unterschiedlich starker Transgenaktivität erhalten und Aufspaltungsverhältnisse gefunden, die nicht den Mendelschen Gesetzen folgten. Umfangreiche Untersuchungen zur Segregation transgener Selektionsmarker haben gezeigt, daß bei Tabak 8 bis 36 % (Heberle-Bors *et al.* 1988, Topping *et al.* 1991) und bei *Arabidopsis thaliana* 10 bis 50 % (Schmidt und Willmitzer 1988, Mittelsten Scheid *et al.* 1991) der Primärtransformanten das Transgen phänotypisch nicht entsprechend den Mendelschen Gesetzen vererben. Meist wurde bei Pflanzen mit solchen phänotypisch abweichenden Vererbungsmustern eine teilweise oder vollständige Inaktivierung des eingebrachten Transgens festgestellt. Die Inaktivierung erfolgt nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz des Transgens, sondern durch epigenetische Mechanismen, die sich in vielen Fällen durch lokale Modifikationen der Chromatinstruktur manifestieren. Für diesen Prozeß der Inaktivierung eingebrachter Transgene und deren eventuell vorhandener endogener Homologe wurde der Begriff *Gene Silencing* geprägt.

Gene Silencing als Ursache für eine mangelhafte Vorhersagbarkeit und Reproduzierbarkeit der Transgenexpression stellt eines der Hauptprobleme bei der Erzeugung und Nutzung transgener Pflanzen dar. Deshalb ist es von enormer Bedeutung, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieses Phänomens beteiligten Mechanismen besser zu verstehen. Darüber hinaus steht *Silencing* als funktionelle Basis für epigenetische Regulationsphänomene auch im Brennpunkt des Interesses der Grundlagenforschung, da eine Vielzahl entwicklungsbiologischer Prozesse über chromatinvermittelte Regulationsmechanismen kontrolliert wird. Ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis dieses Phänomens ist die Identifizierung der an der Entstehung und Aufrechterhaltung von *Silencing* beteiligten funktionellen Komponenten. Ein geeigneter Weg für die Suche nach solchen Komponenten ist die

Isolation von Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, *Silencing* vollständig auszubilden. Die Isolation von Mutanten setzt jedoch die Verfügbarkeit eines geeigneten funktionellen Testsystems bei Pflanzen voraus. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ein transgenes *Silencing*-Testsystem etabliert werden, mit dem die Isolation von *Silencing*-Suppressormutanten möglich ist. Die erhaltenen Mutanten können zur Identifizierung von Proteinen führen, die an der Etablierung und Regulation von *Silencing*-vermittelnden, epigenetisch aktiven Chromatinstrukturen beteiligt sind und würden dadurch zum besseren Verständnis des Phänomens *Silencing* beitragen.

1.1 Mechanismen der Inaktivierung

Generell kann zwischen zwei verschiedenen Wegen unterschieden werden, die zur Inaktivierung eines Transgens führen. Erfolgt die Inaktivierung durch Unterbinden der Transkription des Gens, spricht man von *Transcriptional Gene Silencing* (TGS). Bei TGS sind die inaktivierten Loci durch charakteristische lokale Modifikationen des Chromatins, wie DNA-Hypermethylierung, Histondeacetylierung, Histonmethylierung und erhöhte Proteinbeladung der DNA gekennzeichnet (zusammengefaßt bei Meyer 2000). Transkriptionell inaktiviert werden bevorzugt solche Gene, die in Form zahlreicher Kopien vorliegen und sich im Genom in räumlicher Nähe befinden. Somit ist TGS i.a. eine Folge von direkten oder invertierten Sequenzwiederholungen. Aus diesem Grund werden für TGS auch oft die Begriffe Homologie-abhängige Geninaktivierung (*homology dependent gene silencing*) und *Repeat*-induzierte Geninaktivierung (*repeat induced gene silencing*) verwendet (Meyer und Saedler 1996, Ye und Signer 1996).

Wird im Gegensatz zu TGS die Inaktivierung nicht durch Transkriptionsregulation, sondern durch schnellen Abbau der transkribierten mRNA realisiert, wird von *Post-transcriptional Gene Silencing* (PTGS) gesprochen (Stam *et al.* 1997). Somit gehört PTGS in Pflanzen, wie *RNA Interference* in Tieren und *Quelling* in Pilzen zu den RNA-vermittelten *Silencing*-Systemen (Fagard *et al.* 2000). Bei der Induktion von PTGS wird von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) der zur Ziel-mRNA komplementäre Strang synthetisiert, so daß doppelsträngige RNA (dsRNA) entsteht, die von einem Ribonuklease III-Enzym (*DICER*) in Bruchstücke von 21 bis 24 Nukleotide zerschnitten wird (Lipardi *et al.* 2001, Bernstein *et al.* 2001, Hamilton und Baulcombe

1999). Diese siRNAs (*small interfering RNA*) vermitteln die gezielte Eliminierung der homologen mRNAs (Sijen *et al.* 2001). Über Wechselwirkung mit Regionen von siRNA-DNA Sequenzidentität kommt es meist zur RNA-induzierten DNA-Methylierung, die jedoch allein keine wesentliche Reduktion der Transkription bewirkt (Jones *et al.* 1999, Matzke *et al.* 2001). In einigen Fällen wird das Inaktivierungssignal in Form der siRNA von Zelle zu Zelle und systemisch durch das Phloem in andere Bereiche der Pflanzen übertragen (Fagard und Vaucheret 2000, Mallory *et al.* 2003).

Neben der sowohl bei transkriptionellem als auch bei posttranskriptionellem *Silencing* auftretenden DNA-Hypermethylierung sind beide Inaktivierungsarten über zahlreiche weitere gemeinsame Proteinkomponenten miteinander verknüpft. So beeinflussen TGS-Suppressormutanten in den pflanzlichen Chromatingenen *DDMI* und *MET1* in gleicher Weise auch PTGS (Morel *et al.* 2000), und Proteine aus der Familie der *Argonaute* (*AGO*) sind sowohl an Histon- und DNA-Methylierung als auch an RNA-vermitteltem *Silencing* beteiligt (Zilberman *et al.* 2003).

Unabhängig vom Mechanismus der Inaktivierung wird der Inaktivierungsstatus innerhalb einer Pflanze stabil über die mitotischen Zellteilungen weitergegeben. TGS wird auch über die Meiose stabil von einer Generation auf die nächste übertragen, während PTGS in jeder neuen Generation erst nach dem Überschreiten eines bestimmten mRNA-Schwellenwertes erneut initiiert wird (Depicker und Van Montagu 1997, Finnegan *et al.* 1998).

1.2 Biologische Funktion von TGS

Die DNA als Träger der primären Erbinformation der Zelle ist in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet, die die Position und Zugänglichkeit individueller Sequenzen, Gene und Regionen kontrolliert. Eine Vielzahl von Untersuchungen an genetischen Modellsystemen wie Hefe und *Drosophila* führten zu der Erkenntnis, daß die räumliche und zeitliche Expression bestimmter Gene in entscheidendem Maße über Veränderungen der Chromatinstruktur der entsprechenden DNA-Domänen reguliert wird. Darüber hinaus sind Veränderungen im Verpackungsgrad bestimmter DNA-Abschnitte entscheidend für die Erstellung und Weitergabe determinierter epigenetischer Programme von einer Zellgeneration auf die nächste (Paro 1993). Die in allen eukaryotischen Organismen weitgehend funktionell konservierten Mechanismen zur Regulation der Chromatinstruktur sind u. a. für die korrekte Funktion der

Centromere und Telomere sowie die Segregation der Chromosomen während der Zellteilung erforderlich. Durch Veränderungen des Chromatins wird auch die entwicklungspezifische Expression homeotischer Gene, X-Chromosomen-Inaktivierung, *Imprinting*, *Nucleolar Dominance* und transkriptionelle Inaktivierung der *Mating-Type* Loci in Hefe vermittelt. Die an der Regulation dieser Phänomene beteiligten Komponenten sind in funktionell gleicher Weise auch für die Entstehung und Kontrolle von *Transcriptional Gene Silencing* (TGS) verantwortlich. Durch die Fähigkeit zur transkriptionellen Inaktivierung repetitiver Sequenzen wird in eukaryotischen Genomen die übermäßige Ausbreitung fremder DNA, wie z. B. transponible Elemente, Retroviren und eingebrachte Transgene (T-DNAs), verhindert (Martienssen 1998, Matzke und Matzke 1998). Die Stilllegung anderer endogener, nicht-transponibler *Repeats* war wahrscheinlich ursprünglich nur eine simple Nebenwirkung dieser Abwehrreaktion gegen fremde DNA, aus der sich dann weitere chromatinvermittelt regulierte Funktionen entwickelt haben. Somit stellt TGS eine stabile, jedoch potentiell reversible epigenetische Veränderung dar, die als Folge einer normalen Entwicklung der Organismen vorkommt und als entwicklungsbiologischer Prozeß die funktionelle Grundlage für chromatinvermittelte Regulationsphänomene bildet.

1.3 DNA-Methylierung bei TGS

Methylierung ist eine bei vielen Organismen beobachtete Veränderung der DNA, die eine bedeutende Rolle bei *Gene Silencing* und Heterochromatisierung spielt (Richards und Elgin 2002). TGS ist immer mit einer erheblichen Methylierung der DNA des inaktivierten Locus verbunden. Dabei korreliert die Stärke der Inaktivierung mit einer zunehmenden DNA-Methylierung des Transgens (Hobbs *et al.* 1990, Linn *et al.* 1990). Wenn nahezu alle Cytosinbasen eines Locus methyliert sind, wird von DNA-Hypermethylierung gesprochen.

Bei der DNA-Methylierung werden die Nukleotidbasen Cytosin und Adenin der DNA durch Methylierung oder Hydroximethylierung enzymatisch modifiziert. Das Wissen über die Funktion der Adeninmethylierung (6N-Methyladenin) ist noch gering. Bisher wurde auch kein Zusammenhang zwischen Adeninmethylierung und *Silencing* nachgewiesen. Deshalb wird unter dem Begriff DNA-Methylierung i.a. nur die Methylierung von Cytosin in Position 5 des Pyrimidinringes (5-Methylcytosin)

verstanden, für die in letzter Zeit einige funktionelle und regulatorische Mechanismen in pflanzlichen und tierischen Zellen aufgeklärt wurden. Dabei hat sich gezeigt, daß die Cytosinbasen z.T. ohne einen bestimmten Sequenzkontext (asymmetrisch bzw. nicht-palindrom), jedoch meist spezifisch in den palindromen Sequenzmotiven CpG und CpNpG (N=A, C oder T) methyliert bzw. demethyliert werden (Bhattacharya *et al.* 1999, Lindroth *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002). Bei Säugetieren ist die DNA-Methylierung weitgehend auf das Motiv CpG begrenzt (Ramsahoye *et al.* 2000). In pflanzlichen Genomen werden zusätzlich das Motiv CpNpG sowie in erheblichem Maß auch asymmetrische Cytosine methyliert (Meyer *et al.* 1994, Jacobson und Meyerowitz 1997). Eine starke asymmetrische Methylierung wird auch im Genom einiger Pilze gefunden (Selker *et al.* 1993, Goyon *et al.* 1994). Die Methylierung symmetrischer Cytosine ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Erhaltung determinierter Methylierungsmuster über die DNA-Replikation. In Säugetieren konnte gezeigt werden, daß die nach der Replikation entstehenden hemimethylierten Sequenzen ein bevorzugtes Substrat für die DNA-Methyltransferase *DNMT1* sind, die die symmetrischen Cytosine des neu synthetisierten DNA-Stranges methyliert (Bestor *et al.* 1988).

In *Arabidopsis thaliana* sind mindestens drei Klassen von DNA-Methyltransferasen für die Erhaltung der Methylierungsmuster erforderlich (Finnegan und Kovac 2000). *MET1* (Methyltransferase 1) bildet eine Klasse mit der höchsten Sequenz- und Funktionshomologie zu der in Säugetierzellen essentiellen Methyltransferase *DNMT1* (Finnegan und Dennis 1993). *MET1*-Mutanten fehlt weitgehend die Methylierung des Motivs CpG. Sie zeigen zahlreiche phänotypische Abnormalitäten, die sich von Generation zu Generation verstärken (Finnegan *et al.* 1996). Eine weitere Klasse von Methyltransferasen bilden die neben der Methyltransferase-Domäne eine Chromo-Domäne enthaltenden Chromomethylasen (Henikoff und Comai 1998). Der wichtigste Vertreter dieser für das Pflanzenreich spezifischen Klasse ist *CMT3* (Chromomethylase 3). Der Chromo-Domäne, die eine für Chromatin-Proteine spezifische Interaktionsdomäne darstellt, wird eine Funktion bei RNA-Protein-Interaktionen (Akhtar *et al.* 2000) und der Bindung an Chromatinkomponenten (Jackson *et al.* 2002) zugeschrieben. *CMT3*-Mutanten fehlt genomweit die Methylierung im Motiv CpNpG, und die asymmetrische Methylierung ist an einigen Loci reduziert (Bartee *et al.* 2001). Die dritte Klasse von Methyltransferasen in *Arabidopsis thaliana* bilden *DRM1* und *DRM2* (*domains rearranged methylase*). Die katalytische Domäne der *DRMs* zeigt Sequenzhomologie zur Familie der tierischen Methyltransferasen *DNMT3*, die eine bedeutende Klasse von *de novo*-Methyltransferasen bilden (Cao *et al.* 2000). In

Arabidopsis sind *DRM1* und *DRM2* für die initiale Etablierung der Methylierung in allen beschriebenen Sequenzmotiven (CpG, CpNpG und nichtpalindrome Motive) und die Erhaltung der asymmetrischen Methylierung erforderlich [Cao und Jacobsen 2002(a), Cao und Jacobson 2002(b)]. *DRMs* sind somit nur zur Initiation, jedoch nicht zur Aufrechterhaltung von *Silencing* erforderlich, während zuvor inaktivierte Loci in *MET1*- und *CMT3*-Mutanten weitgehend reaktiviert werden.

1.4 Einfluß von Transgenstruktur und Insertionsort auf TGS

Die Fähigkeit zur Induktion von TGS und die Stärke der Inaktivierung wird von der genomischen bzw. chromosomalen Position des Insertionsortes und der Struktur des inserierten Locus bestimmt. Ursächlich für ersteres ist die Tatsache, daß die Chromosomen der meisten höheren Eukaryoten aus charakteristischen Regionen aufgebaut sind, die sich hinsichtlich des Kondensationsgrades unterscheiden. Erfolgt in *Drosophila* oder Hefe der Einbau eines Transgens in oder in der Nähe von heterochromatischen Bereichen, wie Centromer- oder Telomerregionen, wird dieses Transgen i.a. zellklonal oder vollständig inaktiviert (Dorer und Henikoff 1994). Die Inaktivierungsentscheidung wird während der Embryonalentwicklung in jeder Zelle autonom getroffen und zellklonal weitergegeben, so daß phänotypisch eine variegierende Genexpression beobachtet wird. Dieses unter dem Begriff Positioneffektvariegation (PEV) bekannte Phänomen wurde im Ergebnis zahlreicher Untersuchungen beschrieben (Spofford 1976, Reuter und Spierer 1992, Tartof 1994) und hat sich als ein sehr nützliches *in vivo*-Testsystem für die Entstehung und Regulation von Heterochromatin erwiesen (Grigliatti 1991). In Pflanzen steht kein PEV-System zur Verfügung. In zwei weit zurückliegenden Untersuchungen wurde von variegierender Genexpression in *Oenothera lamarckiana* im Zusammenhang mit Translokationen nach Röntgenstrahlmutagenese berichtet (Catcheside 1938 und 1949). Es wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen variegierender Genexpression und heterochromatischer Lokalisierung nachgewiesen. Gegen einen bedeutenden Einfluß von Positionseffekten auf die Genexpression in Pflanzen spricht die Beobachtung, daß z.B. in Mais einzelne transkriptionell aktive Gene innerhalb großer Blöcke hochrepetitiver, hypermethylierter DNA lokalisiert sind (SanMiguel *et al.* 1996; Tikhonov *et al.* 1999). Auch Untersuchungen zur Expression transgener Reporter nach zufälliger Integration in pflanzliche Genome geben Anlaß zu der Vermutung, daß in

Pflanzen, im Vergleich mit *Drosophila*, die Abhängigkeit der Genexpression vom Insertionsort deutlich geringer ist (Schubert 2002). Eine wesentlich stärkere Rolle spielt in Pflanzen die Struktur der inserierten Sequenz, da vor allem solche Gene inaktiviert werden, die am gleichen Locus in Form mehrerer Kopien vorliegen. Die Anzahl der inserierten Genkopien und damit die Architektur des Insertionsortes wird u.a. von der verwendeten Transformationsmethode beeinflusst. So kann bei Agrobakterienvermitteltem Gentransfer in erheblichem Umfang das Auftreten von gekoppelten Mehrfachinsertionen (Tandeminsertionen) der transformierten T-DNA beobachtet werden (De Buck *et al.* 1999). Die dadurch entstehenden direkten und invertierten Sequenzwiederholungen sind in Pflanzen ein bevorzugtes Ziel für TGS (Assaad *et al.* 1993, Matzke *et al.* 1994, Mittelsten Scheid *et al.* 1991). Auch in *Drosophila melanogaster* werden gekoppelte p-Element-Mehrfachinsertionen mit dem *WHITE*-Reporter gen transkriptionell inaktiviert (Dorer und Henikoff 1994). Hier konnte gezeigt werden, daß neben der Anzahl der Sequenzwiederholungen vor allem ihre Orientierung zueinander entscheidend für den Grad der Inaktivierung ist. Invertierte Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) sind erheblich stärker von *Silencing* betroffen als Sequenzen mit gleicher Orientierung (*direct repeats*). Als Schlußfolgerung u.a. aus dieser Beobachtung wurde ein Modell entwickelt, wonach TGS dann auftritt, wenn durch Paarung homologer Sequenzmotive die Bildung von Haarnadel- bzw. Schleifen-Strukturen möglich ist (Dorer und Henikoff 1994). Diese durch die Paarung entstehenden Motive induzieren eine Heterochromatisierung der repetitiven Sequenzen des betreffenden Locus, indem sie die Bindung spezifischer Chromatinkomponenten ermöglichen. Unterschiede im Niveau der Inaktivierung reflektieren die relative Stabilität der gebildeten Strukturen. Im Fall von invertierten Duplikationen ist die Haarnadel- bzw. Schleifenstruktur stabiler, während bei direkten Duplikationen der ungepaarte Zustand überwiegt. Je mehr *Repeats* an einem Locus existieren, desto wahrscheinlicher ist die Bildung von Sequenzpaarungen. Somit ist dieses Modell in der Lage, die Zusammenhänge zwischen Anzahl und Anordnung der Sequenzwiederholungen und der jeweils beobachteten Stärke der Inaktivierung zu erklären.

1.5 Modellsysteme für TGS

Das *Drosophila*-Positioneffektvariegations (PEV)-System ist das am längsten bekannte (Muller 1930) und wahrscheinlich auch sensitivste TGS-Modellsystem. Bei der

ursprünglich beschriebenen Variante dieses Systems ist, infolge von Chromosomenbrüchen und anschließender Umordnung der Fragmente, das zuvor im Euchromatin lokalisierte *WHITE*-Gen in die Nähe eines Blocks centromernahen Heterochromatins verlagert (Schultz 1936). Als Folge sind die normalerweise roten Augen des Wildtyps in der Mutante rot-weiß gefleckt, d.h. die Expression des *WHITE*-Genes variiert (variiert) zellklonal. Mit dem *Drosophila*-PEV-System sind bereits Dosisunterschiede vieler Chromatinproteine nachweisbar, wie sie z.B. bei Mutanten im heterozygoten Zustand (*Haplo*-Suppressor-Effekt) oder nach Einbringen einer zusätzlichen Genkopie (*Triplo*-Enhancer-Effekt) auftreten (Wustmann *et al.* 1989). Diese von *Drosophila* bekannten Effekte können mit keinem der bisher in Pflanzen etablierten TGS-Modellsysteme beobachtet werden. Ob die Ursache hierfür allein in einer zu niedrigen Sensitivität der pflanzlichen *Silencing*-Systeme liegt, oder Dosisunterschiede von Chromatinkomponenten in Pflanzen besser kompensiert werden, ist ungeklärt.

Pflanzliche TGS-Systeme konnten erst mit der Entwicklung von Methoden zur Übertragung von DNA auf Pflanzenzellen etabliert werden, da zuvor keine dem *Drosophila*-PEV-System vergleichbaren *Silencing*-Phänomene beobachtet wurden. Ausnahmen hierzu bilden die bereits erwähnte variiierende Genexpression bei *Oenothera* (siehe Kap. 1.3) und das in Pflanzen dokumentierte Phänomen der Paramutation (zusammengefaßt bei Brink 1973). Bei Paramutanten wird ein "paramutierbares" Allel in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines "paramutagenen" Allels auf dem homologen Chromosom epigenetisch reguliert bzw. inaktiviert (Assaad *et al.* 1993). In den meisten Fällen blieb jedoch die molekulare Ursache der beobachteten Veränderungen ungeklärt.

Mit der Möglichkeit zur Erzeugung transgener Pflanzen offenbarten sich in fast allen verwendeten Systemen *Silencing*-Phänomene (Jones *et al.* 1987, Matzke *et al.* 1989, Hobbs *et al.* 1990, Mittelsten Scheid 1991). Assaad und Signer (1992) etablierten in *Arabidopsis* ein *Silencing*-System, das auf einer Einzelinsertion einer T-DNA basiert, die neben einem funktionellen *HPT*-Gen (Hygromycinphosphotransferase) zwei verschiedene, nicht funktionelle *NPT*-Mutantenallele (Neomycinphosphotransferase) trägt. Die *NPT*-Mutantenallele unterscheiden sich dabei durch je eine nicht überlappende Deletion. Aus den Nachkommen dieser Linie wurden Pflanzen selektiert, bei denen in Folge von Rekombinationsereignissen zwischen den beiden *NPT*-Mutanten eine funktionelle *NPT*-Resistenz entstanden war. Analysen zur Struktur der rekombinierten T-DNA-Insertionen haben gezeigt, daß nur dann eine Inaktivierung des

Transgens auftritt, wenn sequenzhomologe Bereiche vorhanden sind (Assaad *et al.* 1993). Der bedeutende Vorteil dieses *Silencing*-Systems war, daß die verschiedenen, durch Rekombination entstandenen Konstrukte am gleichen genomischen Locus vorlagen, so daß direkte Untersuchungen der Transgenexpression in Abhängigkeit von der T-DNA-Struktur möglich waren. Im gleichen System konnte gezeigt werden, daß RIGS (*repeat induced gene silencing*) durch das Fehlen von *run-on*-Transkripten der inaktivierten Gene gekennzeichnet ist und die betroffenen Loci eine erhöhte Resistenz gegen Nukleasen aufweisen (Ye und Signer 1996).

Ein ähnliches transgenes *Silencing*-System wurde von Mittelsten Scheid *et al.* (1998) zur Isolation erster Suppressormutanten für TGS genutzt. Als *Silencing*-Reportersystem diente eine Linie von *Arabidopsis thaliana*, die einen Locus mit zahlreichen Kopien des Hygromycinphosphotransferase-Transgens (*HPT*) trägt. Diese Linie zeigt infolge der repetitiven Anordnung eine über mehrere Generationen stabile transkriptionelle Inaktivierung des Reportergens und somit Sensitivität gegen Hygromycin (Mittelsten Scheid *et al.* 1996). Nach Mutagenese mit EMS (Ethylmethansulfonat) bzw. schnellen Neutronen konnten aus der M2-Generation 8 Mutanten [*som1 - som8* (*som* für *somniferous*)] selektiert werden, die eine Reaktivierung der Hygromycinresistenz aufwiesen. Mindestens 5 dieser Mutanten (*som1*, 4, 5, 7 und 8) wurden als *ddm1*-Allele identifiziert (Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Jeddelloh *et al.* 1999). Bei einem zweiten Mutanten-Screen gelang nach T-DNA-Mutagenese mit Hilfe des beschriebenen *Silencing*-Systems die Isolation einer weiteren TGS-Suppressor-Mutante [*mom1* (*mom* für *Morpheus' molecule*)] (Amedeo *et al.* 2000).

Ein weiterer Mutanten-Screen wurde in einem aus drei verschiedenen transgenen Markergenen bestehenden *Silencing*-System durchgeführt. Die in diesem System verwendeten transgenen Marker Hygromycinphosphotransferase (*HPT*), Neomycinphosphotransferase (*NPT*) und Chalconsynthase (*CHS*) sind inklusive der für die Anthocyan-Produktion erforderlichen endogenen *CHS*-Kopie wiederum infolge komplexer Mehrfachinsertionen inaktiviert (Davies *et al.* 1997). Nach EMS- bzw. Röntgenstrahl-Mutagenese konnten zwei Mutanten [*sil1* und *sil2* (*sil* für *modifiers of silencing*)] mit reaktivierter Kanamycinresistenz und eine Mutante [*hog1* (*hog* für *homology dependent gene silencing*)] mit reaktivierter bzw. erhöhter *CHS*-Aktivität isoliert werden (Furner *et al.* 1998). Die von den Mutationen betroffenen Gene wurden bisher nicht identifiziert.

Ein sehr effizientes, nicht-transgenes TGS-System bilden die CLARK KENT (*CLK*)-Mutanten. CLARK KENT-Mutanten sind epigenetische Allele (Epi-Mutanten) des

Arabidopsis-SUPERMAN (*SUP*)-Locus, die durch Inaktivierung und Hypermethylierung der *SUP*-Gene gekennzeichnet sind (Jacobson und Meyerowitz 1997). Das spontane Auftreten von *CLK*-Mutanten wird häufig in *MET1*-Antisense-Linien sowie *MET1*- und *DDMI*-Mutanten beobachtet, deren DNA ansonsten genomweit hypomethyliert ist. Die Ursache für das Auftreten dieser Epi-Mutanten ist nicht bekannt (Lindroth *et al.* 2001). Phänotypisch sind die Mutanten durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet (Jacobson und Meyerowitz 1997). Die *CLK*-Mutanten sind im Gegensatz zu transgenen TGS-Systemen rezessiv. Der Mutantenphänotyp ist erblich, jedoch nicht dauerhaft stabil. Zur Nutzung als TGS-Modellsystem wurde aus diesem Grund eine zusätzliche Kopie des *SUP*-Locus transgen eingebracht (Lindroth *et al.* 2001). Das so erhaltene stabilisierte CLARK KENT -Allel (*clk-st*) wurde in einem EMS-Mutageneseexperiment zur Isolation von Mutanten mit reaktivierter *SUP*-Genexpression genutzt. Im Ergebnis wurden Mutationen in den Genen *CMT3* (Chromomethylase 3) (Lindroth *et al.* 2001), *KYP* (KRYPTONITE) (Jackson *et al.* 2002) und *AGO4* (ARGONAUTE 4) (Zilberman *et al.* 2003) identifiziert, von denen zuvor nicht bekannt war, daß sie TGS modifizieren.

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, daß auch in Hefen Phänomene ähnlich der aus *Drosophila* bekannten Positionseffektvariegation auftreten, die sich ebenfalls in Form variegierender Phänotypen manifestieren. Beschrieben wurde variegierende Expression von Genen sowohl in centromernahen Bereichen bei *Schizosaccharomyces pombe* (Allshire *et al.* 1994) als auch Telomerpositionseffekte bei *Saccharomyces cerevisiae* (Gottschling *et al.* 1990). Darüber hinaus treten in *Saccharomyces cerevisiae* auch nicht-variegierende *Silencing*-Phänomene wie die transkriptionelle Inaktivierung von Genen der *Mating-Type*-Loci und rRNA-*Silencing* auf (Grunstein 1998). Mit Hilfe von *Silencing*-Systemen in Hefen, die meist auf Telomerpositionseffektvariegation basieren, wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Produkte als Suppressor oder *Enhancer* auf TGS wirken (Ayoub *et al.* 2003, Boudreault *et al.* 2003, Pidoux *et al.* 2003). Einige dieser Proteine sind Hefe-Homologe bekannter *Drosophila*-PEV-Modifikatoren, während andere neue, zuvor unbekannte Chromatinproteine darstellen. TGS-Systeme in Hefen sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität und einfachen Handhabbarkeit eine wichtige Ergänzung der tierischen und pflanzlichen Systeme und werden deshalb auch oft zur funktionellen Analyse von in heterologen Systemen identifizierten Chromatinkomponenten verwendet (Laible *et al.* 1997, Ishii und Laemmli 2003).

1.6 Chromatinkomponenten mit Funktion bei TGS

Sehr erfolgreich gelang die Identifizierung und Charakterisierung von Chromatinkomponenten mit Suppressor- oder *Enhancer*-Effekt auf TGS mit Hilfe des PEV-Systems in *Drosophila*. Diese zahlreich isolierten, z.T. dosisabhängig wirkenden Heterochromatin-Komponenten und Heterochromatin-modifizierenden Faktoren werden entsprechend ihrer Wirkung auf PEV als *SU(VAR)* (*Suppressor of Variegation*) bzw. *E(VAR)* (*Enhancer of Variegation*) bezeichnet (Grigliatti 1991). Wichtige *Drosophila*-PEV-Suppressoren, zu denen auch strukturell und funktionell konservierte pflanzliche Homologe in *Arabidopsis* gefunden wurden, sind unter anderem Chromatinproteine wie *HPI* (Heterochromatinprotein 1) (Eissenberg *et al.* 1990) und *SU(VAR)3-9* (Tschiersch *et al.* 1994). *SU(VAR)3-9* ist ein SET-Domänen-Protein und der namensgebende Vertreter einer Klasse von Histon H3 Lysin 9 (H3K9) - Methyltransferasen (Schotta *et al.* 2002). *HPI* wiederum bindet mit seiner Chromo-Domäne spezifisch an Lysin 9-methyliertes Histon H3. Diese Bindung ist essentiell für die Bildung von Heterochromatin (Lachner *et al.* 2001, Bannister *et al.* 2001). Aufgrund dieser Zusammenhänge und der evolutionären Konservierung der strukturellen und funktionellen Motive wird diesen Chromatinkomponenten eine Schlüsselfunktion bei der Bildung von Heterochromatin zugeschrieben.

In Pflanzen können alle TGS-modifizierenden Komponenten bzw. deren Mutanten zunächst generell hinsichtlich ihres Einflusses auf die DNA-Methylierung unterschieden werden (Amedeo *et al.* 2000). Zu den in *Arabidopsis* bekannten TGS-Suppressormutanten, bei denen eine Reduzierung der DNA-Methylierung gefunden wird, gehören zunächst die bereits erwähnten Mutanten in den Methyltransferasen *MET1*, *CMT3*, *DRM1* und *DRM2*. Weitere Mutanten, die, obwohl sie nicht für DNA-Methyltransferasen kodieren, eine Reduzierung der DNA-Methylierung hervorrufen, sind *ddm1* (*decreased DNA methylation*) (Vongs *et al.* 1993), *kyp* (KRYPTONITE) (Jackson *et al.* 2002) und *ago4* (ARGONAUTE 4) (Zilberman *et al.* 2003). Der einzige bisher identifizierte Vertreter von TGS-Suppressormutanten ohne Veränderung der DNA-Methylierung ist *mom* (Amedeo *et al.* 2000). *MOM* kodiert für ein neuartiges, chromatinassoziiertes Kernprotein mit repetitiven Domänen und nur kurzen Regionen mit Homologie zu bekannten Proteinen.

DDM1 ist ein Mitglied der *SNF2*-Familie DNA-abhängiger ATPasen und kodiert für ein *SWI2/SNF2*-ähnliches Protein (Jeddeloh *et al.* 1999). Der *SWI/SNF*-Komplex wurde ursprünglich in Hefe identifiziert, spielt dort eine Rolle beim *mating type switch* (*SWI*

für *switch-independent*) und ist involviert in die transkriptionelle Regulation der Glukose-Repression (*SNF* für *sucrose non-fermenting*) (Winston und Carlson 1992). Bei Säugetieren ist der Komplex an transkriptionellen Aktivierungsprozessen und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Kingston *et al.* 1996). Mutanten in *DDMI* fehlt, im Vergleich mit dem Wildtyp, genomweit ca. 70 % der DNA-Methylierung in allen beschriebenen Motiven, obwohl in den Mutanten keine Veränderung der Methyltransferaseaktivität und des Niveaus des erforderlichen Substrates S-Adenosylmethionin gefunden wurde (Kakutani *et al.* 1995). Im Gegensatz zu *MET1*-Mutanten zeigen Mutanten in *DDMI* nur geringe oder keine morphologischen Abnormalitäten (Vongs *et al.* 1993).

Mutanten in *KYP* und *AGO4* sind durch eine reduzierte DNA-Methylierung asymmetrischer Cytosine und von Cytosinen im Motiv CpNpG gekennzeichnet, wobei keine Veränderungen im Motiv CpG beobachtet werden. In *KYP*-Mutanten besteht diese Verringerung der Methylierung genomweit, während bei *Ago4*-Mutanten nur bestimmte Loci demethyliert sind. KRYPTONITE kodiert für ein SET-Domänen-Protein mit starker Homologie zur *SU(VAR)3-9*-Klasse von H3K9 (Histon H3 Lysin 9)-Methyltransferasen (Rea *et al.* 2000, Baumbusch *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2002). In *KYP*-Mutanten unterbleibt infolge der fehlenden H3K9-Methylierung die spezifische Bindung von Chromomethylase 3 (*CMT3*) an das Chromatin, sodaß *KYP*-Mutanten bezüglich der veränderten DNA-Methylierung phänotypisch *CMT3*-Mutanten entsprechen (Jackson *et al.* 2002). Die Bindung von *CMT3* erfolgt dabei nicht direkt an Lysin 9-methyliertes Histon H3, sondern wird über *LHP1* (*Like* Heterochromatin Protein 1) (Gaudin *et al.* 2001), dem *Arabidopsis*-Homologen zum *Drosophila* *HP1* vermittelt, welches sowohl *CMT3* als auch spezifisch Lysin 9-methyliertes Histon H3 bindet (Jackson *et al.* 2002). Da Mutanten in *AGO4* sowohl reduzierte H3K9-Methylierung als auch locusspezifisch reduzierte DNA-Methylierung zeigen, wird *AGO4* eine dem beschriebenen Regulationsmechanismus übergeordnete Funktion zugeschrieben (Zilberman *et al.* 2003).

1.7 Gegenstand der Arbeit

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten bestand darin, Beiträge zur Aufklärung der komplexen Regulationsmechanismen der Chromatinstruktur und deren Bedeutung für differentielle Genaktivität als Grundlage der Zelldifferenzierung in Pflanzen zu leisten.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit in *Arabidopsis thaliana* ein sensitives *Silencing*-Testsystem auf der Basis transkriptionell inaktivierter transgener Reportergene (GUS, Luciferase) etabliert, das die Identifizierung von Proteinen mit Funktion beim Aufbau und der Regulation der Chromatinstruktur im Kern pflanzlicher Zellen erlaubt. Im Gegensatz zu den meisten der bereits existierenden *Silencing*-Systeme (Assaad *et al.* 1993, Mittelsten Scheid *et al.* 1998) basiert bei diesem neuen Testsystem die Selektion von Modifikatoren für TGS nicht auf der Reaktivierung einer Antibiotikaresistenz. Durch die Verwendung von Luciferase als transgener Reporter mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze und guter Quantifizierbarkeit eröffnete sich mit diesem Testsystems die Möglichkeit zur gezielten Suche nach Mutanten mit relativ schwacher oder organspezifischer Transgenreaktivierung, die unter Verwendung eines *Lethalscreen* mittels Antibiotika unerkant blieben. Entsprechend gelang die Isolierung und Charakterisierung von zahlreichen Mutanten, deren Defekte TGS beeinflussen und somit möglicherweise auf Veränderungen der Chromatinstruktur zurückzuführen sind. Von den etwa 100 selektierten putativen *Silencing*-Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit 19 Linien näher charakterisiert und die wahrscheinlichen Mutationsorte von 15 Linien kartiert. Bei zwei allelen Mutanten mit gewebespezifischer *Silencing*-Suppression konnten Punktmutationen im *TTG2*- (*transparent testa glabra 2*) Locus als Ursache für die beobachtete TGS-Suppression identifiziert werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das *TTG2*-Genprodukt in *Arabidopsis* gewebespezifisch an der Kontrolle von TGS in Zellen beteiligt ist, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickelt haben.

Die Eignung des im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten *Silencing*-Testsystems zur funktionellen Analyse pflanzlicher Chromatinproteine wird am Beispiel von Untersuchungen an *AtSUVH2*, einem pflanzlichen SET-Domänen-Protein (Baumbusch *et al.* 2001), gezeigt.