

4 Diskussion

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS. Aufgrund des Mangels an einfach handhabbaren und sensitiven Testsystemen für TGS in Pflanzen wurde zunächst ein neues transgenes Testsystem etabliert, das die effiziente Isolation von *Silencing*-Mutanten erlaubt. Die genetische Charakterisierung der erhaltenen *Silencing*-Linien wurde nur in dem Umfang durchgeführt, wie die Ergebnisse von Bedeutung für die Funktionalität des Testsystems bzw. für die Isolation von TGS-Suppressormutanten waren.

4.1 Etablierung eines neuen Testsystems zur genetischen Analyse von TGS

Fast alle der in pflanzlichen Systemen etablierten TGS-Modellsysteme basieren auf der Inaktivierung transgener Antibiotikaresistenzen (Kilby *et al.* 1992, Assaad *et al.* 1993, Ye und Signer 1996, Mittelsten Scheid *et al.* 1998). Entsprechend erfolgt die Selektion von Modifikatoren für TGS unter Anwendung eines *Lethalscreen* mittels Antibiotika auf Pflanzen mit reaktivierter Antibiotikaresistenz. Diese Methode schließt die Isolation von Mutanten mit relativ schwacher bzw. entwicklungs- oder organspezifischer Transgenreaktivierung weitgehend aus. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit drei transgene Reportergene hinsichtlich ihrer Eignung für ein effizient einsetzbares und sensitives TGS-Modellsystem getestet.

Eignung der transgenen Reporter für ein *Silencing*-Testsystem

Die Untersuchungen zur Expression der Reportergene Luciferase, GUS und GFP haben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Handhabbarkeit und Nachweisbarkeit offenbart. Luciferaseaktivität ist ein an *Arabidopsis*-Pflanzen leicht nachweisbarer, gut quantifizierbarer Marker, der sich hervorragend für die Suche nach Mutanten innerhalb einer größeren Pflanzenpopulation eignet. Die durch Verwendung des Restlichtkamarasystems sehr niedrige Nachweisgrenze für die Luciferaseaktivität, verbunden mit der einfachen Auswertung und Dokumentation der Meßergebnisse über Falschfarbenbilder sowie die zerstörungsfreie Messung der Transgenaktivität in der Ganzpflanze war ausschlaggebend für die hauptsächliche Verwendung des Luciferase-Reportergens.

Der große Vorteil des β -Glucuronidase-Transgens gegenüber Luciferase ist die gute Detektierbarkeit der GUS-Aktivität auf zellulärer Ebene, was z.B. die Identifizierung zellklonaler Reaktivierungs- und Inaktivierungsprozesse ermöglicht. Leider hat die invasive Meßmethode zum Nachweis der GUS-Aktivität entweder den totalen Verlust der Pflanze zur Folge oder, wenn nur wenige Pflanzenteile verwendet werden, kann keine Aussage zur Aktivität des Reportergens im Rest der Pflanze getroffen werden. Deshalb wurden die von Dr. Bettina Tschiersch im Rahmen des Gesamtprojekts erzeugten und charakterisierten TGS-Linien mit dem GUS-Transgen nicht für die Mutantenselektion eingesetzt, sondern vor allem zur Untersuchung putativer Modifikatoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf *Silencing*-Prozesse verwendet.

Das GFP-Reportergen ist aufgrund der zu hohen Nachweisgrenze bei Untersuchungen an ganzen Pflanzen nicht für ein sensitives *Silencing*-Testsystem geeignet. Durch Optimierung der Nachweismethode mittels geeigneter optischer Filtersysteme und spezieller UV-Quellen wäre noch eine Erniedrigung der Nachweisgrenze möglich gewesen. Jedoch hätte der dann erforderliche Meßaufwand keine effiziente Analyse großer Populationen, wie z.B. bei einer Mutantenselektion erlaubt.

Architektur der hergestellten T-DNA-Konstrukte

Die Herstellung der T-DNA-Konstrukte mit 2 bis 4 Luciferase-Expressionskassetten in gleicher und inverser Orientierung erfolgte unter Nutzung der Erkenntnisse über RIGS bzw. TGS, wonach i.a. das Vorhandensein und die physische Nähe homologer DNA-Bereiche für die transkriptionelle Inaktivierung ursächlich und erforderlich ist (Assaad *et al.* 1993, Flavell 1994, Matzke und Matzke 1995, Meyer *et al.* 1994, Meyer und Saedler 1996, Mittelsten Scheid *et al.* 1998). Auf der Grundlage von Beobachtungen in *Drosophila*, wo *Inverted Repeats* besonders starker Inaktivierung unterliegen (Dorer und Henikoff 1994), wurden neben direkten Sequenzwiederholungen auch invertierte Sequenzwiederholungen hergestellt. Die Klonierung direkter Sequenzinversionen gelang jedoch in *Escherichia coli* nicht. Durch Paarung der langen invers orientierten sequenzhomologen Bereiche kommt es zur Bildung von Haarnadelstrukturen, die in *Escherichia coli* entweder nicht repliziert oder sehr schnell bei Rekombinationsvorgängen *recA*-unabhängig deletiert werden (Albertini *et al.* 1982, Leach 1994). Befinden sich unikale Sequenzen zwischen den Sequenzinversionen, ist die Häufigkeit *recA*-unabhängiger Rekombinationen in Abhängigkeit vom Abstand der Sequenzwiederholung erheblich reduziert (Bi und Liu 1996). Deshalb wurde zwischen die invertierten sequenzhomologen Bereiche der Selektionsmarker *NPT II* eingefügt.

Luciferaseaktivität der verschiedenen T-DNA-Linien

Bereits bei den ersten Analysen zeigten primärtransgene Pflanzen mit mehreren Luciferase-Expressionskassetten auf der T-DNA fast immer eine deutlich niedrigere Luciferaseaktivität als Pflanzen mit nur einer Expressionskassette. Dies bestätigt die bereits zur Herstellung der Konstrukte berücksichtigten Beobachtungen vieler Autoren (Dorer und Henikoff 1994, Ye and Signer 1996), die TGS stets im Zusammenhang mit dem Auftreten repetitiver DNA-Bereiche beobachtet haben. Auch die in den folgenden Generationen beobachtete z.T. bis zum totalen Verlust der Luciferaseaktivität fortschreitende Inaktivierung korreliert mit den Ergebnissen vergleichbarer Versuche (Kilby *et al.* 1992).

Die Erzeugung der verschiedenen T-DNA-Linien diente vor allem dem Ziel, möglichst stark und über mehrere Generationen stabil inaktivierte Luciferaselinien zu erhalten. Aufgrund der Beobachtung, daß z.B. in *Drosophila* Sequenzinversionen besonders starker Inaktivierung unterliegen (Dorer und Henikoff 1994), wurde erwartet, daß Pflanzen mit den Konstrukten LUC 2 und LUC 5 (*inverted repeats*) die geringste Luciferaseaktivität aufweisen. Jedoch wurde spätestens in der F2-Generation deutlich, daß vor allem Pflanzen, die das Konstrukt LUC 4 (nur *direct repeats*) tragen, besonders starke Transgeninaktivierung zeigen.

Von pflanzlichen Modellsystemen liegen bisher keine Erkenntnisse zum Einfluß direkter bzw. invertierter Sequenzwiederholungen auf die Stärke von TGS vor. Aufgrund der niedrigen Anzahl untersuchter Pflanzen und vor allem mangels ausreichender Kenntnisse über die exakte Architektur der erzeugten T-DNA-Insertionen können allerdings auch aus den hier beobachteten Unterschieden bezüglich der Transgenexpression der verschiedenen Konstrukte keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Transgen-Repeat-Struktur und Grad der Inaktivierung abgeleitet werden. Hierzu wären Untersuchungen zur jeweils entstandenen Struktur der T-DNA-Insertionen bei zahlreichen unabhängigen Insertionsereignissen nötig.

Charakterisierung der T-DNA-Insertionen

Bei Analysen zur Segregation der Luciferase-Transgene wurden in 3 von 6 näher untersuchten Linien mit dem Konstrukt LUC 4 unabhängig segregierende Mehrfachinsertionen der T-DNA nachgewiesen. Bezogen auf primärtransgene Pflanzen mit einer und mehreren unabhängig segregierenden T-DNA-Insertionen sind die gefundenen Verhältnisse vergleichbar mit den Ergebnissen von Segregationsanalysen

anderer Agrobakterien-vermittelter Transformationen von *Arabidopsis thaliana* (Kilby *et al.* 1992).

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Segregationsanalysen lassen die durchgeführten *Southern*-Analysen das Vorhandensein abhängiger Mehrfachinsertionen (Tandeminsertionen) vermuten. Tandeminsertionen und noch komplexere Mehrfachinsertionen sind ein für Agrobakterien-vermittelte Transformationen charakteristisches und häufig beobachtetes Phänomen. Dabei erfolgt vor der Integration in das Genom die Bildung von Konkatemeren aus mehreren T-DNAs (De Neve *et al.* 1997, Krizkova und Hroudá 1998). Sowohl direkte als auch invertierte Wiederholungen der T-DNA treten auf (Jorgensen *et al.* 1987, De Buck *et al.* 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten 6 Linien wurden zuvor wegen ihrer besonders niedrigen Luciferaseexpression aus einer Gesamtzahl von 16 mit dem Konstrukt LUC 4 transformierten Pflanzen selektiert. Möglich ist, daß mit dieser Vorselektion auf niedrige Transgenexpression gleichzeitig eine Selektion auf Tandeminsertionen erfolgte, da nach einem Modell von Dorer und Henikoff (1994) TGS insbesondere dann auftritt, wenn durch Paarung sequenzhomologer Bereiche große und stabile Haarnadel- bzw. Schleifen-Strukturen entstehen können. Eine Tandeminsertion bedeutet sowohl eine Verdopplung der Anzahl von Sequenzwiederholungen an einem Locus, als auch, abhängig von der Orientierung der T-DNAs, die Möglichkeit der Entstehung invertierter Sequenzwiederholungen. Beides wirkt prinzipiell verstärkend auf TGS, da besonders große Bereiche repetitiver Sequenzen entstehen.

Zum Nachweis der Existenz von Tandeminsertionen in den ausgewählten Linien wären Analysen zur exakten Architektur der entstandenen Insertionen erforderlich. Solche Untersuchungen erwiesen sich oft als unmöglich, da iPCR-Experimente und die Klonierung der inserierten T-DNAs aufgrund des hohen Anteils repetitiver Sequenzen nicht erfolgreich waren (De Buck *et al.* 1999). Aus diesem Grund ist auch die Architektur der komplexen T-DNA-Insertionen in den zur Selektion von TGS-Suppressormutanten genutzten *Silencing*-Systemen von Mittelsten Scheid *et al.* (1996) und Davies *et al.* (1997) bislang unbekannt. Erfolgreiche Untersuchungen zur Struktur von Tandeminsertionen wären nur dann möglich, wenn die gekoppelten Insertionen aus zwei in ihrer Sequenz verschiedenen T-DNAs aufgebaut sind (De Buck *et al.* 1999).

Auswahl geeigneter Linien für ein *Silencing*-Testsystem

Für die Suche nach TGS-Suppressormutanten im Rahmen eines EMS-Mutagenese-experiments waren insbesondere extrem stark inaktivierte Linien erforderlich. Deshalb wurde in der Folge, entsprechend den Ergebnissen zur Untersuchung der Luciferaseaktivität, ausschließlich mit Linien gearbeitet, die das Konstrukt LUC 4 mit der höchsten Transgeninaktivierung tragen. Um die Wirkung putativer Modifikatoren für TGS sowohl im Hinblick auf Reduzierung als auch auf Verstärkung der Transgeninaktivierung untersuchen zu können, wurden je eine GUS- und eine Luciferaselinie ausgewählt, die zwar erheblich reduzierte, jedoch bei allen Nachkommen noch gleichmäßig und hinreichend nachweisbare Transgenexpression aufweisen (partiell inaktivierte Linien). Unter der Annahme, daß vor allem die Anordnung der Luciferasegene entscheidend für die transkriptionelle Inaktivierung ist, wurden hierfür Linien gewählt, die das gleiche Konstrukt wie die stark inaktivierten Linien tragen (LUC 4 bzw. GUS 3).

Aufgrund der Anforderungen an die Ausgangslinien hinsichtlich der Stärke der Transgeninaktivierung konnten bei der Entscheidung für die ausgewählten Linien die Ergebnisse der Charakterisierung der T-DNA-Insertionen nicht berücksichtigt werden. Entsprechend sind die gewählten Ausgangslinien durch komplexe T-DNA-Insertionen gekennzeichnet, deren Architektur im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation

In Abhängigkeit der Nachweisbarkeit von *Run-On*-Transkripten des inaktiven Locus wird zwischen transkriptioneller (TGS) und posttranskriptioneller (PTGS) Inaktivierung unterschieden (Dehio und Schell 1994). Durch *Nuclear Run-On*-Transkription an isolierten Zellkernen der inaktivierten Linien konnte nachgewiesen werden, daß die Inaktivierung bei 4 der 5 untersuchten Linien auf transkriptioneller Ebene reguliert ist. Der im Vergleich zu den anderen Linien für die Linie 8 gefundene Unterschied in der Art der Inaktivierung wird durch abweichende Ergebnisse bei weiteren Untersuchungen unterstützt. Die posttranskriptionell inaktivierte Linie 8 unterscheidet sich auch hinsichtlich der nachweisbaren Luciferase-Restaktivität von den anderen 4 Linien dahingehend, daß bei keiner der aus dieser Linie untersuchten Pflanzen Luciferase-Restaktivität, z.B. in den Keimblättern, nachweisbar war. Dies unterstützt das Ergebnis der *Run-On*-Transkription, da die systemische Übertragbarkeit des Signals zur posttranskriptionellen Inaktivierung eine zellklonale Restaktivität des Transgens

ausschließt (Voinnet und Baulcombe 1997, Fagard und Vaucheret 2000). Als ein weiterer Unterschied konnten nach der Mutagenese aus den M2-Nachkommen der Linie 8 im Vergleich zu den anderen Linien wesentlich weniger Pflanzen mit reaktivierter Transgenexpression selektiert werden. Aus welchem Grund die Luciferase-Expressionskassetten der Linie 8 im Gegensatz zu den anderen Linien posttranskriptioneller Inaktivierung unterliegen, ist nicht bekannt. Eine denkbare Erklärung wäre, daß die Summe der Transkripte von mehreren unabhängigen und somit nicht homologieabhängig inaktivierbaren Insertionen den zur Induktion posttranskriptioneller Inaktivierung erforderlichen mRNA-Schwellenwert übersteigt. Eine weitere Möglichkeit ist, daß nach Rekombination innerhalb einer bzw. zwischen mehreren T-DNAs die Bildung von *antisense*-mRNA-Fragmenten erfolgt, was RNAi (*RNA interference*) -vermittelt zur posttranskriptionellen Inaktivierung führt.

In keiner der inaktivierten Linien konnte mittels *Northern*-Analyse Luciferase-mRNA nachgewiesen werden. Jedoch wird in den meisten der TGS-Linien noch *NPT II*-mRNA akkumuliert. Dies verdeutlicht, wie homologieabhängig bzw. sequenzspezifisch die Vorgänge bei der transkriptionellen Inaktivierung repetitiver DNA-Bereiche in Pflanzen ablaufen. Da die *NPT II*-Sequenz auf der T-DNA unikal vorliegt, erfolgt keine homologieabhängige Inaktivierung. Darüber hinaus kann aufgrund dieser Beobachtung ausgeschlossen werden, daß die Inaktivierung der Luciferasegene die Folge eines Positionseffektes ist, der auf die T-DNA wirkt, da in diesem Fall auch keine *NPT II*-mRNA-Transkription stattfinden sollte.

Luciferase-Restaktivität in den TGS-Ausgangslinien

Besonders bei Pflanzen erfordern Umwelteinflüsse und die fortschreitende Entwicklung eine ständige Anpassung der Genexpression an die veränderten Bedingungen. Einige Untersuchungen an genetischen Modellsystemen wie Hefe und *Drosophila* geben Anlaß zu der Vermutung, daß die räumliche und zeitliche Expression zahlreicher Gene in erheblichem Maß über Veränderungen der Chromatinstruktur der entsprechenden DNA-Domänen reguliert wird. Dafür wäre eine ständige Neu- bzw. Umorganisation des Chromatins erforderlich. Daß in Folge solcher Prozesse auch bei TGS entwicklungs- und umweltabhängige Schwankungen der Inaktivierungsstärke auftreten, ist vorstellbar. Voraussetzung zum Nachweis dieser verhältnismäßig geringen Veränderungen ist ein hinreichend sensitives Testsystem, wie es im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Mit Ausnahme der posttranskriptionell inaktivierten Ausgangslinie 8 zeigen viele Pflanzen der anderen Ausgangslinien Luciferase-Restaktivität in den Keimblättern sowie in alten

und absterbenden Blättern. Solche entwicklungsspezifischen bzw. alterungsbedingten Schwankungen der Inaktivierungsstärke konnten bei TGS erstmals im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die im Vergleich zu anderen TGS-Modellsystemen wesentlich höhere Sensitivität des neu etablierten Luciferase-*Silencing*-Systems.

Reaktivierung der Transgenexpression bei inaktivierten Linien

Für die Suche nach Suppressormutanten für TGS war die prinzipielle Reaktivierbarkeit der inaktivierten Luciferasegene von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden die beiden zur Reaktivierung inaktivierter Transgene häufig verwendeten Hemmstoffe für chromatinmodifizierende Proteine 5-Aza-Cytidin und Trichostatin A hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Transgenexpression der inaktivierten Linien untersucht. Unter Verwendung des Hemmstoffs 5-Aza-Cytidin konnte gezeigt werden, daß eine beträchtliche Reaktivierung der Luciferaseexpression möglich ist. Nach Einbau in die DNA während der Replikation ist 5-Aza-Cytidin ein kompetitiver Inhibitor (Substratanaloga zu Cytosin-Nukleotiden) für die DNA-Methyltransferase, die die Übertragung von Methylgruppen auf Position 5 des Pyrimidinringes der Cytosinbasen der DNA vermittelt (Santi *et al.* 1983, Jones 1985). Die Reduzierung der Cytosin-Methylierung durch 5-Aza-Cytidin führt in Pflanzen zur Reaktivierung transkriptionell inaktivierter Transgene (Kilby *et al.* 1992, Kumpatla *et al.* 1997). Somit korreliert die beobachtete Reaktivierung der Luciferaseaktivität mit den Daten anderer Autoren.

Trichostatin A wird als spezifischer Inhibitor für die Histondeazetylase verwendet (Yoshida *et al.* 1990). In verschiedenen möglichen Positionen azetylierte Histone sind kennzeichnend für besonders transkriptionell aktive Bereiche des Chromatins (Turner *et al.* 1992, Braunstein *et al.* 1993, Lee *et al.* 1993, Kuo *et al.* 1996). Entsprechend führt die Inhibierung der Histondeazetylase zu einem hyperazetylierten Zustand der Histone in zuvor deazetylierten Chromosomenbereichen, wie z.B. Telomer- und Centromerregionen (Hecht *et al.* 1995). Die daraus resultierende Auflockerung der Chromatinstruktur hat Einfluß auf die Genaktivität transkriptionell inaktivierter Bereiche (Ekwall *et al.* 1997). Diese Ergebnisse wurden vor allem bei Untersuchungen an Hefe und in tierischen Systemen, wie *Drosophila* und Mauszelllinien, erhalten. Über den Effekt der Inhibierung der Histondeazetylase bei Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Chen und Pikaard (1997) konnten in *Brassica*-Hybriden unter Verwendung von Trichostatin A eine Reaktivierung von transkriptionell inaktivierten rRNA-Genen zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder bei niedrigen noch bei sehr hohen

Konzentrationen von Trichostatin A eine Reaktivierung der Luciferaseexpression beobachtet werden. Da die Pflanzen insbesondere bei der hohen Konzentration von 5 µg/ml Trichostatin A mit stark reduziertem Wachstum reagierten, kann eine zu geringe Aufnahme des Inhibitors weitgehend ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für die nicht-Reaktivierbarkeit der Luciferasetranskription könnte sein, daß in Pflanzen die bloße Hyperazetylierung der Histone nicht in jedem Fall ausreichend ist, um eine transkriptionelle Reaktivierung herbeizuführen. Im Gegensatz zu Hefe und tierischen Systemen, bei denen z.B. DNA-Methylierung eine deutlich geringere Rolle spielt, könnten bei Pflanzen zusätzliche Inaktivierungsmechanismen wirken. Ein Hinweis hierauf ist, daß die gleichzeitige Gabe von 5-Aza-Cytidin und Trichostatin A bei Pflanzen keine additive Wirkung zeigte (Chen und Pikaard 1997). Dies bedeutet zum einen, daß Cytosinmethylierung und Histondeazetylierung bei der Inaktivierung innerhalb eines gemeinsamen Reaktionsweges wirken (Chen und Pikaard 1997) und zum anderen, daß ein weiterer von diesen Prozessen unabhängiger Regulationsmechanismus existieren könnte, der eine stärkere Reaktivierung verhindert.

Methylierungsstatus der Luciferasegene in den Ausgangslinien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Methylierungsstatus der Luciferase-Expressionskassetten haben gezeigt, daß die DNA der Luciferasegene in den inaktivierten Linien in hohem Maß methyliert ist. Dies betrifft die beiden analysierten Sequenzmotive CpG und CpNpG in gleicher Weise. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen zahlreicher Autoren, wonach TGS immer mit einer erheblichen Methylierung der DNA des inaktivierten Locus verbunden ist (Meyer *et al.* 1994, Ye und Singer 1996).

Für die Luciferase-Expressionskassetten der partiell inaktivierten Linie 2 konnte gezeigt werden, daß die von Generation zu Generation fortschreitende Transgeninaktivierung mit einer zunehmenden DNA-Methylierung korreliert. Kilby *et al.* (1992) konnten, vergleichbar mit den hier erhaltenen Ergebnissen, in 2 Fällen eine über 4 Generationen fortschreitende Transgeninaktivierung und Hypermethylierung nach Transformation einer T-DNA-kodierten Kanamycinresistenz in *Arabidopsis* beobachten. Auch Hobbs *et al.* (1990) und Linn *et al.* (1990) beschrieben in Tabak bzw. *Petunia* eine in Abhängigkeit der Stärke der Inaktivierung zunehmende DNA-Methylierung des Transgens.

4.2 Isolation und Charakterisierung neuer Suppressormutanten für TGS

Die Reaktivierung bzw. Erhöhung der Luciferaseaktivität diente als Selektionskriterium bei der Isolation der TGS-Suppressormutanten. Als putative Mutanten wurden nur solche Pflanzen selektiert, deren Luciferaseaktivität deutlich höher war als die Restaktivität der anderen, parallel kultivierten M2-Pflanzen. Die gleichzeitige Bearbeitung aller putativen TGS-Suppressormutanten, bei denen Samen erhalten wurde, war aufgrund der großen Anzahl nicht möglich. Deshalb wurden nach wiederholter Analyse eines Teils der isolierten Mutanten in der M3-Generation 19 Mutantenlinien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Als Kriterien für diese Auswahl wurden die Homogenität der Transgenreaktivierung innerhalb der M3-Nachkommen, die Stärke der TGS-Suppression sowie besonders auffällige und dadurch gut reselektierbare pleiotrope Phänotypen berücksichtigt.

Bei der Selektion von Pflanzen mit erhöhter Transgenexpression konnten im Vergleich mit den Ergebnissen eines funktionell analogen Experiments (Mittelsten Scheid *et al.* 1998) erheblich mehr putative Mutanten selektiert werden. Mittelsten Scheid *et al.* (1998) konnten aus 80 000 mit EMS und weiteren 120 000 mit Neutronenstrahlen mutagenisierten M2-Nachkommen nach Reselektion insgesamt 8 Mutanten (*som1 - som8*) isolieren, die eine zuvor inaktivierte repetitive Anordnung von Hygromyзинphosphotransferasegenen reaktivieren. Mindestens 5 dieser Mutanten (*som1, 4, 5, 7* und *8*) wurden als *ddm1*-Allele identifiziert (Mittelsten Scheid *et al.* 1998, Jeddeloh *et al.* 1999). Obwohl die exakte Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Mutanten aufgrund der nicht abgeschlossenen Reselektion (M3-Generation) nicht feststeht, kann durch Hochrechnung der bisherigen Ergebnisse die Selektion von etwa 30 - 40 durch Reselektion verifizierter Mutanten aus ca. 50 000 untersuchten M2-Nachkommen angenommen werden. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl primär selektierter putativer Mutanten ergibt sich bei Mittelsten Scheid *et al.* (1998) für die EMS-Mutagenese eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf 16 000 M2-Nachkommen. Für die Neutronenstrahlen-Mutagenese ergibt sich eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf 5 700 M2-Nachkommen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutantenselektion ergibt sich eine Mutationsfrequenz von einer putativen Mutante auf ca. 300 M2-Nachkommen. Ein Vergleich der so ermittelten Mutationsfrequenzen ist nur unter der Annahme etwa gleicher Mutagenesebedingungen möglich. Dies verdeutlicht allein der von Mittelsten Scheid *et al.* gefundene Unterschied zwischen EMS- und Neutronenstrahlen-

Mutagenese. Da jedoch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Mutationsfrequenz im Vergleich mit den Ergebnissen von Mittelsten Scheid *et al.* zwischen 20 und 50 mal höher ist, kann ein Unterschied in der Stärke der Mutagenese als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Vielmehr bestätigt das Ergebnis die dieser Arbeit zugrundeliegende Vermutung, daß durch Etablierung eines sensitiveren Testsystems für TGS die Isolation einer wesentlich höheren Anzahl putativer Modifikatoren für TGS möglich ist. Jedoch wurden von fast 40 % der primär isolierten Mutanten (M2-Generation), meist aufgrund mangelnder Fertilität der Pflanzen, keine Samen erhalten. Für den Fall einer Wiederholung der Mutantenselektion zur Isolation weiterer TGS-Suppressormutanten wäre zur Erhaltung dieser infertilen Mutanten die sofortige Kreuzung mit Wildtyppflanzen erforderlich. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutantenselektion wurden aufgrund der hohen Anzahl putativer Mutanten keine Kreuzungen zur Erhaltung der infertilen Pflanzen realisiert.

Transgenexpression in den isolierten Mutanten

Der überwiegende Teil struktureller und regulatorischer Chromatinkomponenten sollte aufgrund ihrer Erforderlichkeit für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Chromatins in allen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert sein. Demzufolge ist bei TGS-Suppressormutanten, die solche Chromatinkomponenten betreffen, i.a. eine konstitutive Reaktivierung der Luciferaseaktivität zu erwarten. Entsprechend wurde auch bei den meisten der näher untersuchten Mutanten kein spezifisches Reaktivierungsmuster festgestellt. Eine Ausnahme bilden die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4, die eine spezifische Luciferase-Reaktivierung in Trichomen und entlang der Blattränder aufweisen. Im Hintergrund der partiell inaktivierten GUS-Linie ist der TGS-Suppressor-Phänotyp auf die abnormal ausgebildeten Trichome beschränkt. Mit den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurden erstmals TGS-Suppressormutanten identifiziert, die eine gewebespezifische Transgenreaktivierung aufweisen. Die Produkte der von den bisher bekannten *Silencing* suppressierenden Mutationen betroffenen Gene sind entsprechend ihrer generellen Erforderlichkeit bei der Ausbildung einer korrekten Chromatinstruktur in allen Geweben konstitutiv exprimiert.

Methylierungsstatus der Luciferasegene in den isolierten Mutanten

Die Analysen zum Methylierungsstatus haben bei etwa 50 % der isolierten TGS-Suppressormutanten eine z.T. drastische Reduzierung der DNA-Methylierung der Luciferase-Expressionkassetten offenbart. Nach einem Modell von Amedeo *et al.*

(2000) können in Pflanzen TGS-modifizierende Mutanten in 2 Klassen unterschieden werden: Mutanten mit Veränderung der DNA-Methylierung, wie die bekannten TGS-Suppressormutanten *ddm1* (Vongs *et al.* 1993), *cmt3* (Lindroth *et al.* 2001) und *kyp* (Jackson *et al.* 2002) sowie TGS-Suppressormutanten ohne Veränderung der DNA-Methylierung, wie *mom* (Amedeo *et al.* 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten bestätigen dieses Modell, wonach bei TGS methylierungsabhängige und unabhängige Prozesse wirken. Ob TGS-Mutanten ohne veränderte Methylierung Komponenten eines Reaktionsweges sind, der bei der Inaktivierung nach der DNA-Methylierung (*downstream*) wirkt oder vollständig unabhängig funktionieren, ist bisher ungeklärt.

Die bereits bekannten TGS-Suppressormutanten mit veränderter DNA-Methylierung sind in den meisten Fällen durch eine für das jeweils mutierte Gen charakteristische motifspezifische Veränderung der DNA-Methylierung gekennzeichnet. Dadurch ist es möglich, bei neu isolierten Mutanten mit Hilfe von Untersuchungen zum DNA-Methylierungsstatus, erste Hinweise bezüglich des eventuell betroffenen Gens zu erhalten. Bei der Mutante 7/2/11 wurde eine drastische DNA-Hypomethylierung im Motiv CpNpG festgestellt, während die Methylierung im Motiv CpG unverändert bleibt. Diese drastische, auf das Motiv CpNpG beschränkte Reduzierung der DNA-Methylierung ist charakteristisch für *CMT3*-Mutanten. Da der für die Mutante 7/2/11 bei der Kartierung ermittelte wahrscheinliche Mutationsort zudem im Bereich des *CMT3*-Locus liegt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß 7/2/11 ein *CMT3*-Allel darstellt. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) im *CMT3*-Locus der Mutante 7/2/11 eine Punktmutation nachweisen, die zu einem Aminosäureaustausch in der Methyltransferase-Domäne des *CMT3*-Gens führt.

Pleiotrope Phänotypen der TGS-Suppressormutanten

Im Vergleich mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp *Columbia* sind 14 der 19 ausgewählten Mutanten in der M3-Generation durch deutliche morphologische Unterschiede gekennzeichnet. Für 6 dieser Mutanten konnte gezeigt werden, daß die gefundenen morphologischen Phänotypen nicht die Folge weiterer eigenständiger Mutationen, sondern pleiotrope Effekte der TGS-supprimierenden Mutationen sind (s. Tab. 5). Unter der Annahme, daß viele der isolierten Mutationen strukturelle oder regulatorische Komponenten des Chromatins betreffen, ist eine mögliche Erklärung für das häufige Auftreten pleiotroper Phänotypen, daß die mit dem TGS-Suppressor-Phänotyp

verbundenen Veränderungen bei der Regulation der Chromatinstruktur oft auch zur Fehlregulation bei der Expression weiterer endogener Gene führen. In Folge der TGS-Suppression können z.B. die Transkriptmengen wichtiger homeotischer Gene verändert sein oder zuvor durch TGS transkriptionell inaktivierte Bereiche des Genoms exprimiert werden (Steimer *et al.* 2000). Ein bereits bekanntes und besonders eindrucksvolles Beispiel hierfür sind die zahlreichen unterschiedlichen, nicht mendelnden pleiotropen Phänotypen bzw. morphologischen Veränderungen bei *MET1*-Mutanten, die durch veränderte Genexpression als Folge von DNA-Hypomethylierung bzw. partieller Hypermethylierung zuvor unmethylierter Loci entstehen (Finnegan *et al.* 1996, Ronemus *et al.* 1996). Einige dieser Phänotypen sind die Folge epigenetischer Veränderungen (Epi-Mutanten) des *Arabidopsis*-*SUPERMAN* (*SUP*)-Locus, die u.a. durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet sind und als *Clark Kent*-Mutanten bezeichnet werden (Jacobson und Meyerowitz 1997). Der Phänotyp ist erblich, jedoch nicht dauerhaft stabil, so daß bei Segregationsanalysen kein mendelnder Erbgang gefunden wird. Die ähnlichen, jedoch verschieden stark ausgeprägten pleiotropen Phänotypen der Mutanten 7/2/7, 7/4/4 und 12/1/1 sind vergleichbar mit den für *Clark Kent*-Mutanten charakteristischen morphologischen Veränderungen. Zudem wurde in den Kartierungspopulationen dieser Mutanten eine nicht den Mendelschen Gesetzen folgende Vererbung dieser morphologischen Phänotypen gefunden. Diese Beobachtungen legen im Zusammenhang mit den identifizierten Mutationsorten und der zumindest bei den Mutanten 7/2/7 und 7/4/4 festgestellten DNA-Hypomethylierung die Vermutung nahe, daß die Mutanten 7/2/7, 7/4/4 und 12/1/1 *MET1*-Allele darstellen. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) im *MET1*-Locus dieser drei Mutanten jeweils eine Punktmutation nachweisen, die zu einem vorzeitigen Translationsstoppsignal bzw. zu einem Aminosäureaustausch führt.

4.3 Kartierung der Mutationsorte der isolierten Mutanten

Mit 15 der 19 ausgewählten Mutanten wurden Versuche zur Kartierung der mutierten Loci durchgeführt. Im Ergebnis dieser Grobkartierung nach Selektion einer Kartierungspopulation über den TGS-Suppressor-Phänotyp wurde für diese Mutanten jeweils ein wahrscheinlicher Mutationsort lokalisiert. Dadurch war die Überprüfung der Mutanten auf mögliche Allelien untereinander und zu bereits bekannten TGS-

Suppressormutanten möglich. Alternativ hätte die Testung auf Allelie durch Komplementationsanalysen nach Kreuzung der Mutanten wegen der bei einigen Linien z.T. erheblich reduzierten Fertilität Probleme bereitet. Aufgrund der verschiedenen ermittelten Mutationsorte kann u.a. eine Allelie der phänotypisch ähnlichen und aus einem Pool selektierten Mutanten 12/1/1, 12/1/3 und 12/1/7 ausgeschlossen werden. Im Fall der später als allel identifizierten Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurde dagegen bereits bei der Grobkartierung eine weitgehende Übereinstimmung der Mutationsorte gefunden.

Für die Mutanten 9/2/1 und 9/2/6, die aus einem Pool selektiert wurden, identische Phänotypen zeigen und am gleichen Locus kartieren, wird angenommen, daß beide Mutanten die Nachkommen einer M1-Pflanze sind. Obwohl diese wie auch die Mutanten 6/1/2 und 12/2/7 nicht die für einige *DDMI*-Mutanten charakteristischen pleiotropen Phänotypen zeigen (Finnegan *et al.* 1996), lassen die reduzierte DNA-Methylierung und die physische Nähe der identifizierten Mutationsorte zum *DDMI*-Locus vermuten, daß diese vier Mutanten *DDMI*-Allele sind. Im Rahmen einer auf den erhaltenen Ergebnissen aufbauenden Arbeit konnte C. R. Fiedler (Martin-Luther-Universität Halle, Institut für Genetik) durch Sequenzierung des *DDMI*-Locus in den Mutanten 6/1/2, 9/2/1 und 12/2/7 Punktmutation nachweisen, die direkt bzw. in Folge mutierter Exon-Intron-Übergänge zu einem vorzeitigen Translationsstoppsignal führen. Aufgrund der als wahrscheinliche Mutationsorte identifizierten Loci (s. Abb. 3.16), ist davon auszugehen, daß die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter bearbeiteten putativen Mutanten 6/4/1, 12/1/3 und 12/1/7 nicht zu einer der bisher bekannten TGS-Suppressormutanten (*mom*, *cmt3*, *ago4*, *drm1*, *drm2*, *kyp*, *met1* und *ddm1*) allel sind.

4.4 Untersuchungen an den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Der Mutationsort der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 liegt im Locus F3G5.5

Die Analysen zur Segregation der pleiotropen Phänotypen, die Kartierungsdaten und der charakteristische TGS-Suppressor-Phänotyp gaben deutliche Hinweise, daß 9/2/5 und 12/4/4 allele Mutanten sind. Nach Eingrenzung des Mutationsortes der Mutanten erfolgte die Identifizierung des mutierten Gens durch vergleichende RT-PCR-Analysen zur Akkumulation von mRNA an dem aufgrund der Position und der Annotierungsdaten als Mutationsort wahrscheinlichsten Locus F3G5.5. Diese Vorgehensweise beruht auf der Erkenntnis, daß in eukaryotischen Organismen mRNA mit einem durch eine *Frame-*

Shift-Mutation oder ein Nonsense-Kodon bedingten vorzeitigem Translationsstopkodon im Vergleich zur WT-mRNA oft wesentlich schneller abgebaut wird. Durch diesen *Nonsense-Mediated Decay* (NMD) genannten Prozeß wird die Entstehung von verkürzten und somit nicht funktionellen Proteinen verhindert. Umfangreiche Kenntnisse zu NMD existieren vor allem bei Hefe und Säugerzellen (Maquat 1995, Culbertson 1999, Hentze und Kulozik 1999). Domeier *et al.* (2000) konnten an NMD-defekten Mutanten von *Caenorhabditis elegans* zeigen, daß eine funktionelle Kopplung zwischen NMD und dem schnellen RNA-Abbau bei RNAi (*RNA interference*) besteht. Über NMD in Pflanzen ist relativ wenig bekannt, jedoch wurde bei der Untersuchung von Mutanten u.a. in Reis (Isshiki *et al.* 2001), Bohne (Jofuku *et al.* 1989) und Erbse (Dickey *et al.* 1994) ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Menge des mutierten Locus gefunden. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte bei den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 eine erhebliche Reduktion der mRNA des mutierten Locus F3G5.5 im Vergleich zum WT-Allel festgestellt werden. In beiden Mutanten wurde in diesem Locus jeweils ein vorzeitiges Translationsstoppsignal gefunden, das den beobachteten NMD auslöst. Das Translationsstoppsignal TGA ist in beiden Fällen durch Mutation eines Guanin-Nukleotids zu einem Adenin-Nukleotid in dem für Tryptophan kodierenden Triplet TGG entstanden. Diese Art von Punktmutationen ist charakteristisch für eine chemische Mutagenese mit EMS, bei der vorwiegend die Purin-Nukleobasen Adenin oder Guanin entsprechend in die jeweils andere Nukleobase umgewandelt wird.

Die Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 sind Mutanten in *TTG2*

Der in den Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 mutierte Locus F3G5.5 wurde im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojekts als putatives WRKY-Typ DNA-bindendes Protein annotiert (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000) (<http://www.arabidopsis.org>). Eine Literaturrecherche über WRKY-Proteine im Anschluß an die Identifizierung der Mutationen in 9/2/5 und 12/4/4 hat ergeben, daß für den Locus F3G5.5 bereits eine Mutante mit dem charakteristischen Trichomphänotyp isoliert wurde (Eulgem *et al.* 2000), über die jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keine veröffentlichten Informationen vorlagen. Dennoch stellte David Smyth (*Monash University*, Victoria, Australien) auf Anfrage freundlicherweise Saatgut dieser in seinem Labor selektierten Mutante für Komplementationsanalysen zur Verfügung. Diese nach Mutagenese mit dem *Arabidopsis*-endogenen *Tag1*- Transposon (Tsay *et al.* 1993) aufgrund des sichtbaren Trichom-Phänotyps selektierte Mutante wurde als *ttg2-1* (*transparent testa glabra 2-1*) und ein zweites selektiertes Allel als *ttg2-2* bezeichnet (Johnson *et al.* 2002).

***TTG2* kodiert für ein DNA-bindendes Protein vom WRKY-Typ**

WRKY-Proteine bilden eine pflanzenspezifische Superfamilie von Transkriptionsregulatoren mit allein 72 Mitgliedern in *Arabidopsis*, die aufgrund struktureller Unterschiede in 3 Gruppen eingeteilt wurden (Riechmann *et al.* 2000, Eulgem *et al.* 2000). Außerhalb der je nach Subtyp ein bis zwei WRKY-Domänen, einer ca. 60 Aminosäuren umfassenden Region, die bei allen Mitgliedern der WRKY-Familie hochkonserviert ist, zeigen die einzelnen Mitglieder eine hohe strukturelle Divergenz. Jede WRKY-Domäne ist über das N-terminale Aminosäure-Sequenzmotiv WRKYGQK definiert, das eine sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt (Eulgem *et al.* 1999). Entsprechend wurden viele WRKY-Proteine aufgrund ihrer Fähigkeit zur spezifischen Bindung an das DNA-Motiv (T)(T)TGAC(C/T) identifiziert (Rushton *et al.* 1995 und 1996), das als W-Box bezeichnet wird. W-Box-Elemente finden sich in der Promotorregion zahlreicher Gene, besonders häufig jedoch bei Abwehrgenen (Rushton und Somssich 1998). Da zudem u.a. in Tabak für einige WRKYs eine Transkriptakkumulation nach Pathogenkontakt beobachtet wurde, ist anzunehmen, daß zumindest einige dieser Proteine als Transkriptionsfaktoren in die Pathogenabwehr involviert sind (Chen und Chen 2000).

Die Mutante *ttg2-1* ist der bisher einzige beschriebene Vertreter von WRKY-Mutanten mit einem morphologischen Phänotyp (Johnson *et al.* 2002). BLAST-Analysen (Altschul *et al.* 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) haben gezeigt, daß *TTG2* zu dem aus Tabak klonierten DNA-bindenden Protein *WRKY2* (Wang *et al.* 1998) (Locus AAD16139.1) die größte Homologie aufweist (45 % Identität der Aminosäuresequenz über einen Bereich von 267 Aminosäuren). Die Homologie beschränkt sich jedoch im wesentlichen auf die konservierten Bereiche der WRKY-Domänen, während andere Sequenzbereiche relativ stark divergieren. *NiWRKY2* wurde aufgrund seiner bei der hypersensitiven Reaktion resistenter Tabakpflanzen nach Infektion mit TMV (*tobacco mosaic virus*) beobachteten sequenzspezifischen DNA-Bindung an das W-Box-Motiv identifiziert (Wang *et al.* 1998). Ähnlich diesem Gen werden viele der bisher untersuchten WRKYs, nach Kontakt der Pflanze mit einem Pathogen, Salicylsäure, Jasmonat, Ethylen oder mechanischer Verwundung transkriptionell aktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *TTG2* unabhängig von Umwelteinflüssen und Wachstumsbedingungen, die auf die Pflanzen wirken (Johnson *et al.* 2002).

Das Expressionsmuster von TTG2 korreliert mit dem Muster der TGS-Suppression

TTG2 ist durch ein spezifisches Expressionsmuster in der Pflanze gekennzeichnet. Johnson *et al.* (2002) konnten mittels *in situ*-Hybridisierung und durch transgene Expression des GUS-Reportergens unter Kontrolle eines 1 kb endogenen *TTG2*-Promotorfragments nachweisen, daß der *TTG2*-Promotor eine sehr spezifische Expression in sich entwickelnden Samenhüllen, in Wurzelspitzen und in allen Entwicklungsstufen der Trichome vermittelt. Ein für die Expression in Wurzelspitzen verantwortliches Promotorelement wurde im Bereich zwischen 700 und 1000 bp oberhalb des Translationsstarts identifiziert. Für die Expression in Trichomen und den Wurzelspitzen verantwortliche Elemente sind zwischen 300 und 700 bp oberhalb des Translationsstarts lokalisiert (Johnson *et al.* 2002). Das spezifische Expressionsmuster lässt auf eine Funktion von TTG2 bei morphologischen Entwicklungsprozessen vor allem in den Zellen schließen, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickeln. Jedoch wird *TTG2* nicht direkt in meristematischen Zellen der L1-Schicht exprimiert (Johnson *et al.* 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten *TTG2*-Mutanten zeigen vor allem in den Trichomen und den äußeren Bereichen junger Blätter eine spezifische Reaktivierung der Luciferaseaktivität. Ein identisches Reaktivierungsmuster konnte bei der für die Komplementationsanalysen verwendeten Mutante *ttg2-1* beobachtet werden. Neben der Expression in Trichomen konnten Johnson *et al.* (2002) insbesondere auch in sehr jungen Blättern eine signifikante Aktivität des *TTG2*-Promotors nachweisen. Somit korreliert das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete charakteristische Muster der TGS-Suppression in *TTG2*-Mutanten mit der von Johnson *et al.* (2002) gefundenen spezifischen Expression des *TTG2*-Gens.

Untersuchungen an periklinalchimären Pflanzen haben gezeigt, daß bei Blättern neben der Epidermis auch die äußeren Bereiche des Mesophylls der meristematischen L1-Schicht entstammen. Demnach ist die in den Blatträndern der Mutanten gefundene Reaktivierung der Luciferaseaktivität ebenfalls mit dem Verlust der Expression von *TTG2* in Zellen erklärbar, die sich aus der meristematischen L1-Schicht entwickelt haben.

Die transgene Expression von TTG2 komplementiert die Phänotypen der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4

Der TGS-Suppressor-Phänotyp und der pleiotrope Trichom-Phänotyp der Mutanten 9/2/5 und 12/4/4 wurden durch transgene Expression des WT-Allels unter Kontrolle eines 1 kb endogenen Promotorfragments komplementiert. Aufgrund der durch den *TTG2*-Promotor vermittelten spezifischen Expression ist anzunehmen, daß zur vollständigen Komplementation aller Phänotypen der *TTG2*-Mutanten diese exakt lokalisierte Expression des *TTG2*-Genprodukts unbedingt erforderlich ist. Zur Untersuchung der Bedeutung der spezifischen Promotoraktivität für die Funktion von *TTG2* bei der Trichombildung und der Etablierung von TGS wären Analysen an Pflanzen mit konstitutiv und induzierbar exprimiertem *TTG2* eventuell hilfreich. Johnson *et al.* (2002) konnten durch Analysen an den Trichommutanten *gl1* (*glabra 1*), *gl2* (*glabra 2*) und *ttg1* (*transparent testa glabra 1*) sowie an Doppelmutanten (*gl1-ttg2*, *gl2-ttg2* und *ttg1-ttg2*) weder eine gegenseitige Beeinflussung der Expression noch eine funktionelle Kopplung zwischen *TTG2* und den bei diesen Mutanten betroffenen Genprodukten nachweisen. Eventuell besteht jedoch eine zumindest teilweise funktionelle Redundanz zwischen *GL2* und *TTG2*, die auch ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen (Johnson *et al.* 2002). Aus diesem Grund wären auch Untersuchungen zur Wirkung von *gl2*-Mutanten auf TGS sinnvoll.

Ein weiterer, für die Trichommutanten *ttg1* und *ttg2* charakteristischer Phänotyp ist das Fehlen der dunkelbraunen Färbung der Samenhülle. Im Wildtyp beruht die Färbung der Samenschale auf der Oxidation farbloser Tannin-Vorstufen zu Tannin während der Reifung der Samen. In den Mutanten erfolgt keine Akkumulation der Tannin-Vorstufen, da *TTG1* für die Expression von *BAN* (*BANYULS*) erforderlich ist, einem Gen, das den ersten Schritt der Tannin-Biosynthese kontrolliert (Nesi *et al.* 2000). Erste Untersuchungen lassen vermuten, daß wahrscheinlich auch *TTG2* als Transkriptionsfaktor direkt die Expression von *BAN* und eventuell weiterer Gene der Tannin-Biosynthese kontrolliert (Johnson *et al.* 2002).

4.5 Identifizierung des Mutationsortes der Mutante 6/8/1

Phänotypische und genetische Gemeinsamkeiten wiesen auf eine Allelie der Mutanten 6/8/1 und *bru1-1* (*BRUSHY*) hin. Das Allel *bru1-1* wurde mittels T-DNA-Mutagenese erzeugt und auf der Suche nach Mutanten mit erhöhter Sensitivität gegenüber dem

DNA-schädigenden Stoff MMS (Methylmethansulfonat) isoliert (Takeda *et al.* 2004). Bei der näheren Charakterisierung dieser Mutante wurde ein relativ schwacher TGS-Suppressoreffekt beobachtet, der nicht mit einer Veränderung der DNA-Methylierung verbunden ist. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der Charakterisierung der Mutante 6/8/1. Durch Sequenzanalysen an genomischer DNA der Mutante 6/8/1 wurde im kodierenden Bereich des *BRUI*-Gens eine Punktmutation identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin führt. Entsprechend wurde die Mutante 6/8/1 als Allel *bru1-2* bezeichnet (Takeda *et al.* 2004). Damit ist *bru1* nach *mom* und der im Rahmen dieser Arbeit als TGS-Suppressoren identifizierten *ttg2*-Allele eine weitere *Silencing*-supprimierende Mutante, bei der keine Veränderung der DNA-Methylierung beobachtet wird.

BRUI kodiert für ein offenes Leseraster von 1311 Aminosäuren. Das abgeleitete Protein zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen mit bekannter Funktion. Die Aminosäuresequenz von BRU1 enthält Tetratricopeptid-*Repeats* (TPRs) (Blatch und Lässle 1999) und leucinreiche *Repeats* (LRRs) (Kobe und Deisenhofer 1994), zwei konservierte Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Weiterhin werden für BRU1 *coiled-coil*-Regionen, ein Kernlokalisierungssignal und ein Leucin-*Zipper*-Motiv vorhergesagt, das potentiell mit DNA interagieren kann (Takeda *et al.* 2004).

Der im Mutantenallel *bru1-2* (Mutante 6/8/1) gefundene Aminosäureaustausch ist in der N-terminalen TPR-Region lokalisiert. Durch die Mutation erfolgt ein Austausch der für die Entstehung der antiparallel-helikalen TPR-Struktur essentiellen Aminosäure Glycin in Position 27 des 34 Aminosäuren langen TPR-Motifs (Takeda *et al.* 2004).

4.6 Der Einfluß von *AtSUVH2* auf TGS

Mutationen im *Drosophila*-Heterochromatinprotein SU(VAR)3-9 wirken als starker *Haplo*-Suppressor und *Triplo-Enhancer* auf Positioneffektvariegation (Tschiersch *et al.* 1994). SU(VAR)3-9 gehört zur Familie der SET-Domänen-Proteine und ist eine Histon H3 Lysin 9 (H3K9) -Methyltransferase (Rea *et al.* 2000). In *Arabidopsis* wurden bisher 10 Gene für SU(VAR)3-9-homologe SET-Domänen-Proteine identifiziert (Baumbusch *et al.* 2001). Eines dieser Gene, das ebenfalls für eine H3K9-Methyltransferase kodiert, ist *KYP* (KRYPTONITE) bzw. *SUVH4* (Jackson *et al.* 2002). Mutanten in *KYP* zeigen einen TGS-Suppressor-Phänotyp und reduzierte DNA-

Methylierung im Motiv CpNpG, da in Folge der fehlenden H3K9-Methylierung die spezifische Bindung von Chromomethylase 3 (CMT3) an das Chromatin unterbleibt. Ein weiteres, in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Reuter (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) bearbeitetes pflanzliches SET-Domänen-Protein mit signifikanter Homologie zu SU(VAR)3-9 ist AtSUVH2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, daß die transgene Überexpression von SUVH2 sowohl in der partiell inaktivierten Luciferaselinie als auch in der partiell inaktivierten GUS-Linie verstärkend auf TGS wirkt. In Fortführung dieser Arbeiten konnte von K. Naumann (Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik) unter Verwendung der partiell inaktivierten Luciferaselinie gezeigt werden, daß in *SUVH2-antisense*-Linien TGS signifikant supprimiert ist. Somit konnte festgestellt werden, daß in *Arabidopsis* neben *KYP* mindestens ein weiteres *Drosophila* *SU(VAR)3-9*-homologes Gen an der Regulation von TGS beteiligt ist. Bisher wurde für SUVH2 keine enzymatische Aktivität nachgewiesen, so daß ungeklärt ist, über welchen Mechanismus SUVH2 TGS beeinflusst. Jedoch ist aufgrund der starken strukturellen Homologie zu SU(VAR)3-9 und KYP die Vermutung naheliegend, daß auch SUVH2 eine Histon-Methyltransferase darstellt, die sich möglicherweise durch eine andere Substratspezifität von KYP unterscheidet. Springer *et al.* (2003) postulieren für SUVH2 aufgrund seiner strukturellen Homologie zu SU(VAR)3-9, KYP und weiteren SET-Domänen-Proteinen eine H3K9-Methyltransferase-Aktivität.