

# 1. Einleitung

*Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) gehört zu der Familie der Brassicaceae. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften wurde *Arabidopsis thaliana* als genetisches Studienobjekt vorgeschlagen (Meyerowitz und Pruitt, 1986). Neben ihrer geringen Wuchshöhe und einer kurzen Generationszeit besitzt *Arabidopsis* ein relativ kleines Genom von ca. 100 Mbp. Das Genom ist arm an dispers verteilten, repetitiven Sequenzen. Der haploide Satz besteht aus fünf Chromosomen, (Redei, 1970; Meyerowitz, 1989).

Der Zellkern von *Arabidopsis* präsentiert, wie alle eukaryotischen Kerne, eine komplexe Anordnung von heterochromatischen und euchromatischen Domänen (Fransz et al., 2003). Der Begriff Heterochromatin steht für konstitutives und fakultatives Chromatin. Es sind Chromosomensegmente, die während der Interphase kondensiert bleiben. Sie sind in der zytologischen DAPI-Färbung als helle Spots sichtbar. Molekular beinhalten sie unter anderem Tandem *Repeats*. Biochemisch sind es DNA-Proteinkomplexe, welche insensitive gegen eine DNase I Behandlung sind. Heterochromatin ist transkriptionell inaktiv, spät replizierend und es weist eine geringe meiotische Rekombination auf. Heterochromatin findet man in den Zentromerregionen, den Telomerregionen und den NOR-Bereichen (*Nucleolus Organizing Region*). In diesen Regionen sind die Zytosine des CpG Motivs zu ca. 80% methyliert (Finnegan et al., 1998; Nagaki et al., 2003).

Die Zytosin-Methylierung hat Einfluss auf die transkriptionelle und transpositionelle Aktivität der DNA-Transposons ((Jiang et al., 2003; Kato et al., 2004). In *Arabidopsis thaliana* sind sie stark methyliert und transkriptionell inaktiv (TGS *Transcriptional Gene Silencing*). Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Faktor des TGS-Effektes in *Arabidopsis* (Richards und Elgin, 2002). Mittels der benachbarten Sequenzen des Zytosins werden die DNA-Methylierungen in symmetrische und asymmetrische Motive unterteilt. Als symmetrische Methylierung werden die Sequenzmotive CpG und CpNpG bezeichnet (Lindroth et al., 2001, Jackson et al., 2002). In den letzten Jahren wurden die Mechanismen intensiv untersucht, welche zur Aktivierung oder zur Stilllegung von Genen führt. Für die Identifizierung von DNA- bzw. Histonmethyltransferasen, welche Einfluss auf den TGS haben, mussten Hilfssysteme genutzt werden. Drei verwendete Systeme werden in folge genauer erläutert.

## 1.1 Identifizierungssysteme für TGS-Suppressoren in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* können Suppressormutanten für TGS mit Hilfe der T-DNA- bzw. der EMS-Mutagenese identifiziert werden. Ein transgenes *Silencing*-System wurde von Mittelsten Scheid *et al.* (1998) etabliert. Als Reportersystem diente die *lineA* (*Arabidopsis thaliana* Ökotyp Zürich), welche 15 T-DNA-Kopien mit dem Selektionsmarker Hygromycin enthält (Probst *et al.*, 2003). Durch die repetitive Anordnung der T-DNA geht die transkriptionelle Aktivität des Hygromycins in den Nachkommen verloren, da diese hochmethyliert vorliegen (Mittelsten Scheid *et al.*, 1996). In diesem Essay konnten, mittels EMS, acht Mutanten *som1-som8* (*som* für *somniferous*) isoliert werden, die eine Reaktivierung der Hygromycin-Resistenz aufwiesen.

Im gleichem System wurde mittels der insertionellen T-DNA-Mutagenese die TGS-Suppressor-Mutante *mom1* isoliert (*mom* für *Morpheus´molecule*, Amedeo *et al.*, 2000). Diese Mutante führt zur Reaktivierung von stillgelegten Sequenzen, wie TSI (*Transcriptionally Silent Information*) und den perizentrischen *Repeats* (Tariq *et al.*, 2002).

Ein sehr sensitives Selektionssystem für die Isolierung von TGS-Suppressoren wurde von I. Hofmann unter Verwendung des Reportergens *LUZIFERASE* etabliert (Hofmann, 2004). Das Gen *LUZIFERASE* wurde mehrfach und gleichgerichtet in die T-DNA integriert und in *Arabidopsis thaliana Columbia* transformiert. Ausgehend von vollständig inaktivierten *LUZIFERASE*-Linien konnten nach EMS-Behandlung Mutanten isoliert werden, in welchen die *LUZIFERASE* reaktiviert vorlag. Mit diesem System gelang es, Allele für die Gene *ddm1*, *met1* und *cmt3* zu isolieren (Hofmann, 2004).

Das letzte System, welches vorgestellt werden soll, sind die *clark kent* (*clk*)-Mutanten. Die *clark kent*-Mutanten sind epigenetische Allele (Epimutanten) des *Arabidopsis* SUPERMAN (*SUP*)-Locus. Die *SUP*-Gene sind hypermethyliert und somit inaktiviert (Jacobson and Meyerowitz, 1997). Das spontane Auftreten von *clk*-Mutanten wurde in *MET1-Antisense*-Linien, sowie in *met1*- und *ddm1*-Mutanten beobachtet. Die Ursache ist noch nicht bekannt, da die DNA in den genannten Mutanten hypomethyliert vorliegt (Lindroth *et al.*, 2001). Phänotypisch sind die rezessiven *clk*-Mutanten durch eine veränderte Anzahl von Blütenorganen gekennzeichnet (Jacobson und Meyerowitz, 1997). Der Mutantenphänotyp ist nicht stabil, deshalb wurde eine zusätzliche Kopie des *SUP*-Locus eingebracht (Lindroth *et al.*, 2001). Das stabilisierte *clark kent*-Allel (*clk-st*) wurde in einer EMS-Mutagenese für die Isolation von Suppressoren mit reaktivierter *SUP*-Genexpression genutzt.

Es konnten die Gene *CMT3* (*CHROMOMETHYLASE 3*, Lindroth et al., 2001), *KYP* (*KRYPTONITE* oder *SUVH4*, Jackson et al., 2002) und *AGO4* (*ARGONAUTE 4*, Zilberman et al., 2003) identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Systeme wurden DNA- und Histon-modifizierende Proteine gefunden, die infolge beschrieben werden.

## **1.2. DNA modifizierende Gene mit Einfluss auf den TGS in *Arabidopsis thaliana***

Das Protein DDM1 zeigt eine Ähnlichkeit zur SNF2-Familie aus Hefe (Finnegan et al., 1998; Smith et al., 2003). Es ist eine DNA-abhängige ATPase und kodiert ein SWI2/SNF2-ähnliches Protein (Jeddeloh et al., 1999, Smith et al., 2003). Der SWI2/SNF2-Komplex spielt 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). Die *ddm1*-Mutanten zeigen eine DNA-Hypomethylierung (Kakutani et al., 1999, Brzeski et al., 2003), eine Dekondensation der Chromozentren (Grendel et al., 2002) und eine Reaktivierung der Expression des in *Arabidopsis thaliana* stark methylierten und stillgelegten Gens *PAI2* (kodiert eine Phospho-ribosylantranilat Isomerase; Jeddeloh et al., 1998). Es erfolgt in *ddm1*-Mutanten eine Reaktivierung der Expression des DNA-Transposons *CACTA* (Kato et al., 2004), sowie die Reaktivierung der Expression der Retrotransposons *ATHILA* und *TA3* (Kakutani et al., 1995; Xiao et al., 2003; Kato et al., 2003). Für die *ddm1* Mutanten wurde eine reduzierte Methylierung am Histon H3K9 und eine erhöhte Methylierung am Histon H3K4 gezeigt (Gendrel et al., 2002; Chang et al., 2005). Die *ddm1*-Pflanzen wiesen nur geringe oder keine morphologischen Abnormalitäten auf (Vongs et al., 1993).

Mit Hilfe der aufgeführten Selektionssysteme konnten zwei DNA-Methyltransferasen identifiziert werden. Das Protein MET1 (Methyltransferase 1) zeigt eine hohe Homologie zu der Methyltransferase DNMT1 (Finnegan und Dennis, 1993). In Säugetieren wurde nachgewiesen, dass nach der Replikation die hemimethylierten DNA-Sequenzen ein Substrat für die DNA-Methyltransferase DNMT1 sind und dass die Zytosine im symmetrischen Motiv CpG des neu synthetisierten DNA-Stranges methyliert werden (Bestor et al., 1988).

In *Arabidopsis met1*-Mutanten wurden vor allem eine Reduktion der Methylierung im Motiv CpG nachgewiesen. Die Mutanten bilden zahlreiche phänotypische Veränderungen aus, die von einer Generation zur nächsten Generation verstärkt werden (Finnegan et al., 1996).

Die zweite identifizierte DNA-Methyltransferase ist das Protein CMT3 (CHROMO-METHYLASE 3), welche neben der Methyltransferase-Domäne eine Chromo-Domäne enthält (Henikoff und Comai 1998). In der *cmt3*-Mutante ist die Methylierung im Motiv CpNpG und in asymmetrischen Motiven an bestimmten Loci reduziert (Bartee et al., 2001). Diese Reduktion der DNA-Methylierung betrifft das Transposon *TA3* und den stillgelegten *SUPERMAN*-Locus (Okamoto et al., 2001). Des Weiteren ist eine Bindung der Chromodomäne von CMT3 mit den methylierten Histonpositionen H3K9 und H3K27 nachgewiesen wurden (Lindroth et al., 2004). Die Chromo-Domäne wurde zuerst in den *Drosophila* Proteinen HP1 und Polycomb (PC) identifiziert. Für das HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1) konnte eine Bindung der Chromo-Domäne an das Histon H3 für Modifikationen Di- und Trimethyl K9 nachgewiesen werden (Bannister et al., 2001; Fischle et al., 2003), während die Chromo-Domäne von PC an methyliertem Histon H3K27 bindet (Paro et al., 1996, Jackson et al., 2002).

Die Proteine *DRM1* und *DRM2* (*domains rearranged methylase*) stellen eine weitere Gruppe von Methyltransferasen dar. Ihre katalytische Domäne zeigt eine sequenzielle Homologie zur Familie der Methyltransferasen *DNMT3* (Cao et al., 2000). In *Arabidopsis* sind *DRM1* und *DRM2* für die initiale Etablierung der DNA-Methylierung in symmetrischen und asymmetrischen Sequenzmotiven verantwortlich, sowie für die Erhaltung der asymmetrischen Methylierung [Cao et al., 2002(a); Cao et al., 2002(b)]. Die *DRM* Proteine sind zur Etablierung nicht aber zur Aufrechterhaltung von *Silencing* erforderlich.

In *met1*- und *cmt3*-Mutanten werden im Gegensatz dazu inaktivierte Sequenzen durch eine Reduktion der DNA Methylierung an spezifischen Loci reaktiviert. Des Weiteren wurde für verschiedene *TGS*-Mutanten eine Mobilisierung von Transposons gezeigt, wenn die DNA-Methylierung reduziert ist (Singer et al., 2001; Miura et al., 2001; Chan et al., 2005). Neben der DNA-Methylierung besitzt die Histonmethylierung einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Genen. In der EMS-Mutagenese für die Isolation von Suppressoren des TGS Effektes mit reaktiverter *SUP*-Genexpression konnten neben DNA-Methyltransferasen auch Histon modifizierende Proteine, wie KRYPTONITE identifiziert werden.

### **1.3 Histon modifizierende Proteine in *Arabidopsis thaliana***

Das Protein KYP (KRYPTONITE oder SUVH4) gehört zu den SU(VAR)3-9-homologen Proteinen. KYP war die erste identifizierte HMTase aus *Arabidopsis* (Jackson et al., 2002).

Es methyliert das Histon H3 an der Position Lysin 9. In der *kyp* Mutante ist die DNA-Methylierung am hochmethylierten *clark kent* Allel des SUPERMAN Locus reduziert, speziell im symmetrischen Motiv CpNpG.

In der Mutante *kyp* ist die normale Expression der *SUP*-Gene und der normale Blütenphänotyp wiederhergestellt (Johnson et al., 2002). Des Weiteren ist KYP an der Aufrechterhaltung, nicht aber an der Etablierung der Zytosin-Methylierung beteiligt (Malagnac et al., 2002). Das Protein KYP oder SUVH4 weist eine starke Homologie zur SET-Domäne des Proteins SU(VAR)3-9 aus *Drosophila melanogaster* auf. In *Arabidopsis* wurden insgesamt 15 SU(VAR)3-9 homologe Proteine gefunden, welche in zwei Gruppen gegliedert werden können. Die SUVH-Gruppe enthält 10 Proteine mit einer YDG-Domäne im N-Terminus. Die fünf Proteine der SUVR-Gruppe enthalten im N-Terminus keine YDG-Domäne (Baumbusch et al., 2001).

Ihre SET-Domänen werden von zwei Zystein-reichen-Regionen begrenzt, der pre- und post-SET-Domäne bzw. C- und N-SET-Domäne. Die C-SET-Domäne ist wichtig für die enzymatische Aktivität von HMTasen (Marmorstein, 2003). Für die SU(VAR)3-9 homologe SET-Domäne konnte eine Histon Methyltransferase Aktivität an den Positionen H3K9, H3K27 und H4K20 nachgewiesen werden. Diese HMTase Aktivitäten zeigen auch andere SU(VAR)3-9 orthologe Proteine in verschiedenen Organismen, wie zum Beispiel das Säugerprotein SUV39 (Rea et al., 2000) und das Hefeprotein Clr4p (Nakayama et al., 2001). Das *Drosophila* Protein SU(VAR)3-9 wurde als Suppressor des PEV-Effektes identifiziert (Tschiersch et al., 1994) und es kodiert eine Histon H3K9 spezifische HMTase (Schotta et al., 2002).

#### **1.4 SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis thaliana***

In Sequenzanalysen konnte nur für das Gen *SUVH4* eine Exon/Intron-Struktur mit 4 Intronen nachgewiesen werden (Baumbusch et al., 2001). Die anderen *SUVH*-Gene enthalten keine Intronen innerhalb ihres ORF's. Es ist möglich, dass das Gen *SUVH4* bzw. *KRYPTONITE* das ursprüngliche Gen der SU(VAR)3-9 homologen Gruppe in *Arabidopsis* darstellt. Die anderen *SUVH*-Gene könnten durch Retrotranspositionen entstanden sein. Diese Retrotransposition kommt häufig bei Proteinen vor, die an der mRNA Translation beteiligt sind, oder es sind Gene mit nuklearer Funktion betroffen.

Diese *RPC's* (*retroposed copies*) sind entweder funktionelle Gene oder es handelt sich um Pseudogene ohne Funktion. So wurden 219 HMG-Proteine im Menschen identifiziert, die durch Retrotransposition entstanden sind (Strichman-Almashanu et al., 2003).

Das HMG ist ein Kernprotein, welches an die kleine Furche der DNA bindet und somit einen Effekt auf die DNA-Aktivität hinsichtlich ihrer Replikation, Transkription und ihrer Kompaktheit hat (Churchill et al., 1991; Claus et al., 1994). Der Mechanismus der Retrotransposition bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die große Anzahl von SET-Domänen Proteinen in *Arabidopsis*.

Im Gen *SUVH6* wurden keine Intronen lokalisiert. Für dieses Protein konnte ebenfalls eine HMTase-Aktivität für Histon H3K9 nachgewiesen werden (Jackson et al., 2004). Für die Gene *SUVH2* und *SUVH3* konnten im nicht kodierenden Bereich Intronen identifiziert werden (Baumbusch et al., 2001). Die Proteine *SUVH3*, *SUVH7* und *SUVH8* enthalten im N-Terminus zusätzliche AT-Hook-Motive, die in der Lage sind, an der DNA zubinden (Churchill und Travers, 1991). Für die Proteine *SUVH3* und *SUVH7* konnte jeweils ein AT-Hook-Motiv und für das Protein *SUVH8* zwei Motive lokalisiert werden. Die AT-Hook-Motive sind Bestandteil der HMG-Y/I-Proteine.

Das DNA-bindende AT-Hook-Motiv konnte auch in nicht HMG-Proteinen identifiziert werden. So besitzt das *Drosophila* Protein *ASH1* neben einem AT-Hook-Motiv auch eine SET-Domäne und einen PHD-Finger (*Absent, Small or Homeotic Discs*; Tripoulas et al., 1996). Nach Tripoulas et al. (1996) ist für die Bindung des Proteins *ASH1* an die DNA das AT-Hook-Motiv von Bedeutung. Die SET-Domäne des Proteins *ASH1* kodiert eine aktive HMTase, welche die euchromatischen Histonmodifikationen an den Histonen H3K4, H3K9 und H4K20 katalysiert (Byrd et al., 2003). Das Trithorax-Gruppen Protein *ASH1* vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des sonst stillgelegten Gens *Ubx* (Ultrabithorax) in *Drosophila* und die Deplatzierung der Proteine *HP1* und *Pc*, die normalerweise an den Promotor von *Ubx* binden und ihn reprimieren (Beisel et al., 2002). Orthologe *ASH1*-Proteine wurden in einer Vielzahl tierischer und pflanzlicher Organismen identifiziert. So enthält *Arabidopsis* sieben *ASH*-Proteine, davon gehören vier Proteine zur *ASH1*-homologen Gruppe und drei Proteine zählen zu der *ASH1*-verwandten Gruppe (Baumbusch et al., 2001). Die SET-Domäne befindet sich nicht im C-Terminus des Proteins, sondern ist in der Mitte des Proteins lokalisiert.

Die konservierte SET-Domäne ist nicht nur in den Proteinen SU(VAR)3-9 und ASH1 enthalten, sondern auch in den *Drosophila* Proteinen TRITHORAX und E(Z).

Die Gruppe der TRITHORAX Proteine in *Arabidopsis* umfasst insgesamt 12 Proteine. Sie zeigen eine Homologie zur SET-Domäne der TRITHORAX Proteine aus verschiedenen Organismen.

In *Arabidopsis* wurden sieben verwandte und fünf homologe TRITHORAX Proteine identifiziert. Über die Funktion dieser Gruppe ist mit Ausnahme des Proteins ATX1 noch nichts bekannt. Das *Arabidopsis* Protein ATX1 reguliert die Entwicklung der Blütenorgane und besitzt eine Histon H3K4 Methyltransferaseaktivität (Alvarez-Venegas et al, 2003). In den *atx1*-Mutanten sind die homeotischen Gene *API*, *AP2*, *AG* und im geringeren Maße *PI* und *AP3* dereguliert. *ATX1* wird zur Aufrechterhaltung des normalen Expressionsniveaus dieser Gene benötigt. Der aktivierende Effekt von ATX1 ist Gen spezifisch (Alvarez-Venegas et al, 2005). Es ist ein epigenetischer Regulator mit Histon H3K4 Methyltransferaseaktivität, dessen SET-Domäne im Gegensatz zum *Drosophila* TRX Protein allein in der Lage ist, die Position Lysin 4 zu methylieren (Alvarez-Venegas et al, 2003; Alvarez-Venegas et al, 2005).

Für das humane TRX-homologe Protein MLL/ALL konnte ebenfalls eine Histon H3K4 HMTase-Aktivität nachgewiesen werden (Milne et al., 2002).

Eine weitere Gruppe von SET-Domänen Proteinen stellen die E(Z)-Homologen dar. Das *Drosophila* Protein E(Z) gehört zu den Polycomb-Gruppen Genen Pc(G). Es konnte eine Histon-Methyltransferaseaktivität für Histon H3 an der Position K27 festgestellt werden (Ebert et al., 2004). Das Protein E(Z) ist wichtig für Etablierung und Aufrechterhaltung der Repression einiger homeotischer Gene (*Ubx*, *Antennapedia*, *Bithorax*) in *Drosophila melanogaster* (Muller et al., 2002). E(Z) ist eine Untereinheit des Polycomb-Komplexes ESC-E(Z) [ESC-Extra Sex Comb].

Der Verlust des funktionellen Proteins E(Z) hat einen Verlust der Lokalisierung des PcG-Komplexes an den Polytänschromosomen zur Folge, da dieser Komplex nicht mehr in der Lage ist mit den *Polycomb Repressive Complex 1* oder *2* zu interagieren (Czermin et al., 2002). Des weiteren wird die Bindung von POLYCOMB (PC) an einen PRE-Komplex (*Polycomb response element*) reduziert, das führt zu einer Expression der stillgelegten Gene (Lund et al., 2004). Das Protein POLYCOMB enthält eine Chromo-Domäne, diese interagiert mit trimethylierten Histon H3 Lysin 27 und mit dem Aminosäuremotiv ARKS (Fischle et al., 2003; Min et al., 2003).

Durch eine Dimerisierung der Chromo-Domänen des Proteins POLYCOMB erfolgt eine zusätzliche Erkennungsspezifität (Min et al., 2003). Das Protein E(Z) methyliert das Histon H3 an der Position 27, während POLYCOMB an methylierten H3K27 bindet.

Die ersten identifizierten SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis* gehörten zu der ENHANCER OF ZESTE [E(Z)]-Gruppe. Zu dieser Gruppe gehören die Proteine CLF, MEA und SWN (EZA1).

Das erste identifizierte E(Z)-homologe Protein CLF wurde von Goodrich et al. (1997) als ein Repressor des homeotischen Blütengens *AGAMOUS* (*AG*) beschrieben. In *clf*-Mutanten wird *AG* in Blättern und im späten Entwicklungsstadium der Blütenknospe expremiert. Das Protein SWN (Chanvivattana et al., 2004) weist eine starke Ähnlichkeit zu CLF auf und handelt teilweise wie CLF. Für CLF und SWN konnte eine Histon Methyltransferase Aktivität für das Histon H3K27 anhand von *clf/swm*-Doppelmutanten nachgewiesen werden (Cao et al., 2004; Lindroth et al., 2004).

MEDEA (MEA; Grossniklaus et al., 1998; Kinoshita et al., 1999; Autran et al., 2005) ist ein Repressor der Genexpression und der Endospermentwicklung. Es wird in den sich entwickelten femalen Gametophyten und im Endosperm expremiert und induziert *Imprinting* für die paternalen Gene. MEDEA reguliert die Samenentwicklung mittels des MADS-Box Gens *PHERES1* (Autran et al., 2005). Die Aktivierung des maternalen *MEDEA*-Allels benötigt die Funktion von DEMETER, welches eine pflanzliche DNA-Glycosylase ist (Berger, 2003; Autran et al., 2005). Neben DEMETER wurde auch das Protein ROS1 als DNA-Demethylase beschrieben. In beiden Mutanten konnte eine erhöhte DNA-Methylierung nachgewiesen werden (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002).

*Arabidopsis* PcG-Gene kontrollieren die transkriptionelle Repression von Entwicklungsgenen im Euchromatin, nicht aber die Methylierung des Histons H3K27. Zusammenfassend modifiziert E(Z) das Chromatin dahingehend, dass es für eine transkriptionelle Repression der Zielgene sorgt, während die TrxG eine Aktivierung der Zielgene veranlasst. Für die Methylierung der Histone an den Lysinpositionen ist die SET-Domäne erforderlich (Marmorstein, 2003; Xiao et al., 2003; Bottomley, 2004).

## **1.5 Die Rolle der Histon-Modifikationen in Eukaryoten**

Die Histon-Methylierung spielt neben der DNA-Methylierung eine bedeutende Rolle in der Genregulation.



Die Histon-Methylierung H3K9, H3K27 und H4K20 sind ein spezifischer epigenetischer Marker für stillgelegte Chromatinbereiche, während die Methylierung am Histon 3 in den Positionen K4, K36 und K79 an aktive Bereiche bindet (Fischle et al., 2003; Lachner et al., 2003). Durch unterschiedliche Methylierungsgrade, wie Mono-, Di- und Tri-Methylierung sind weitere Feinregulierungen möglich (Breiling et al., 2002). In *Drosophila* sind die Histon-Modifikationen H3 Mono-, Di-, Trimethyl-K9 und -K27 sowie die Modifikation Trimethyl-H4K20 spezifisch für Heterochromatin (Ebert et al., 2004).

In *Arabidopsis* sind die Histon-Modifikationen H3 Mono-, Dimethyl-K9 und -K27 sowie monomethyl-H4K20 mit Heterochromatin assoziiert. Die Histon-Modifikationen Trimethyl-H3K9, Trimethyl-H3K27, Di- und Trimethyl-H4K20 wurden dagegen in euchromatischen Bereichen lokalisiert (Fischer, 2005; Naumann et al., 2005).

Neben dem Grad der DNA-Methylierung sind diese Histon-Modifikationen die Grundlage des epigenetischen Histonkods für die transkriptionelle Aktivität und Aufrechterhaltung des "on" bzw. "off" Zustandes der DNA.

Des Weiteren ist nicht nur die Methylierung der Lysine möglich, sondern es erfolgt auch die Methylierung der Arginine. Für Arginin-Histonmethyltransferasen (HRMT) konnten keine einheitlichen Domänen identifiziert werden, sie sind hauptsächlich transkriptionelle Koaktivatoren (Bauer et al., 2002).

Die *Posttranslationalen* Modifikationen der Histone sind reversible Prozesse, so erfolgt die Abspaltung der Methylgruppen durch Demethylasen (HDM). Eine Histondemethylase ist das erst kürzlich entdeckte Protein LSD1 (*Lysine-specific histone demethylase 1*), welches spezifisch das Histon H3 an der Position K4 demethyliert. LSD1 besitzt eine C-terminale FLAVIN-Domäne, welche eine Homologie zu den Aminoxydasen zeigt (Shi et al., 2004; Forneris et al., 2005).

Eine weitere Modifizierungsmöglichkeit der Histone ist die Azetylierung und Deazetylierung. Diese wird moduliert durch Histonazetyltransferasen und Deazetylasen (Changhe et al., 2005). Die reversible Azetylierung ist korreliert mit Genaktivität in verschiedenen Organismen. Die Histonazetyltransferasen (HAT) katalysieren den Transfer eines Azetylrestes von azetyl-CoA zu der Aminogruppe des Lysins, während Histondeazetylasen (HDAC) diese Modifikation umkehren. In *Arabidopsis* wurden 18 putative Histondeazetylasen und 12 putative Histonazetylasen identifiziert (Pandey et al., 2002). Eukaryotische HDAC's können in drei Klassen gruppiert werden.

Die Unterteilung basiert auf ihre Homologie zu den Hefe Histonazetyltransferasen REDUCED POTASSIUM DEPENDENCY3 (RPD3), HISTONE DEACETYLASE1 (HDA1) und SIRTUIN2 (Pandey et al., 2002; Yang and Seto, 2003).

Die Aktivierung des Gens Plastocyanin *PetE* aus der Erbse ist verbunden mit einer Gewebe abhängigen Hyperazetylierung des Histons H4 in der Enhancer/Promotor-Region (Chua et al., 2001). Studien in Hefe zeigten, dass die Promotoren aktivierter Gene mehr azetyliertes Histon H3 und H4 aufwiesen (Bernstein et al., 2002; Robyr et al., 2002). Die Reduzierung von *AtRPD3A* (*AtHDI*) in *Arabidopsis* führt zu einer Fehlbildung der Blüte und zur Ausbildung von Luftrosetten (Wu et al., 2000).

Der *AtRPD3A* Phänotyp ist assoziiert mit einer Hyperazetylierung des Histons H4 und führt zu einer ektopischen Expression von Regulatoren der Blütengene. Das Protein AtHDA6 (*AtRPD3B*) spielt eine Rolle beim TGS, dass konnte in der HDA6-Mutante *axe1* gezeigt werden. In dieser Linie wurde eine zunehmende Expression des Auxin-Response Transgens, nicht aber der endogenen Auxin-Response Gene nachgewiesen (Murfett et al., 2001).

Weitere Histonmodifikationen sind Phosphorylierung der Aminosäure Serin und Ubiquitinierung der Aminosäure Lysin. Die Phosphorylierung wird durch spezifische Kinasen vermittelt. Die Histon H3 Phosphorylierung ist am Serin 10 assoziiert mit transkriptionell aktivem Chromatinbereichen (Nowak et al., 2004). Eine gut untersuchte Gruppe von Serin/Threonin Kinasen ist die Familie der Aurora-Kinasen. In *Arabidopsis* wurden kürzlich drei Aurora-Kinasen (*AtAUR1*, *AtAUR2* und *AtAUR3*; Kawabe et al., 2005) identifiziert.

Die Ubiquitinierung ist eine weitere reversible Modifizierung der Histon Lysine, hier wird das Ubiquitin über einer Peptidbindung an das Lysin gebunden. In *Tetrahymena* hat die Ubiquitinierung von Histone 2A eine Repression zur Folge (Moore et al., 2002). In Hefe vermittelt das E2-Ubiquitin-konjugierte Enzym UBC2/RAD6 die Ubiquitinierung des Histons H2B an der Position 123. Für eine *rad6*-Mutante und eine Histon H2B (K123R)-Mutation, in welcher das Histon H2B ubiquitiniert ist, konnten Defekte in der Sporulation und mitotischem Wachstum gezeigt werden (Robzyk et al., 2000). Das *Arabidopsis* homologe Protein AtUBC2 ist in der Lage, die Hefe *rad6*-Mutante zu komplementieren (Zwirn et al., 1997).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung und die funktionelle Analyse des Gens *AtSUVH2* in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia.

Zunächst wurde die Expression von *SUVH2* in der Zelle und in der Pflanze untersucht. Es erfolgte die Lokalisierung des Proteins in den Kompartimenten von Zwiebelhaut-epidermiszellen. Des weiteren wurde die Expression von *SUVH2* in verschiedenen Organen der Pflanze *Arabidopsis* untersucht.

In vivo sollten die Effekte von *SUVH2* in *Arabidopsis* analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden transgene Linien verwendet. Es erfolgte eine Analyse des Phänotyps in den transgenen Linien. Des weiteren wurden die dosisabhängigen Effekte von *SUVH2* auf die genomweite Expression untersucht. Es wurden vor allen Veränderungen der Transkriptmengen von Transposons und von Genen der Pathogenabwehr untersucht.

Eine funktionelle Charakterisierung der YDG- und der SET-Domäne des Proteins *SUVH2* erfolgte mittels EMS-Mutagenese. Für diese Analyse wurde eine Überexpressionslinie verwendet.

Des weiteren erfolgte eine Untersuchung hinsichtlich der Interaktion von *SUVH2* mit bereits bekannten DNA- und Histon-modifizierenden Proteinen. Für diese Analyse wurde eine *SUVH2* Überexpressionslinie mit der bekannten Mutantenlinie *ddm1-2* gekreuzt.

Weiterhin wurde der Einfluss von *SUVH2* auf TGS getestet. Als Reporterlinie wurde eine partiell stillgelegte LUC-Linie verwendet und diese mit *SUVH2* Überexpressionslinien gekreuzt. In ihren Nachkommen wurde der Einfluss von *SUVH2* auf die Aktivität der Luziferase untersucht.

Eine weitere Untersuchung dient der Klärung der Reaktion von *SUVH2* auf biotischen Stress. Für diesen Test wurden *Arabidopsis* Linien mit dem RNA-Potyvirus TuMV (*Turnip Mosaic Virus*) infiziert. Es erfolgte eine Analyse der Expression der Su(var)3-9 homologen Gene *SUVH1* bis *SUVH9*.