

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteinen in Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SET-Domänen Protein SUVH2 in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert und funktionell analysiert. SET-Domänen wurden in Proteinen gefunden, die beteiligt sind an der Regulation von Chromatin und der Katalyse der Lysin-Methylierung (Bottomley, 2004; Marmorstein, 2003; Xiao, 2003).

In den letzten Jahren wurden in Pflanzen eine grössere Anzahl von SET-Domänen Proteinen identifiziert als in tierischen Organismen (Baumbusch et al., 2001; Springer et al., 2003). So wurden in *Zea mays* insgesamt 22 SET-Domänen Proteine gefunden (Springer et al. 2003). In *Arabidopsis* konnten 37 Proteine identifiziert werden, wobei für 29 Gene eine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen wurde (Baumbusch et al. 2001). Die vierzehn in *Mais* gefundenen SU(VAR)3-9-homologen Proteine wurden von Springer et al. 2003 als Klasse fünf bezeichnet. Diese Gruppe wurde weiter unterteilt, in Proteine mit und ohne YDG-Domäne, ähnlich den SUVH und SUVR Proteinen in *Arabidopsis* (Baumbusch et al. 2001). Alle Proteine der Klasse fünf wiesen, wie die Proteine aus *Arabidopsis*, eine N-SET/SET/C-SET-Domänen Struktur auf. Eine Analyse der Sequenzen aus *Mais* zeigte, dass nur das YDG/SET-Domänen Gen *SDG118* eine Exon/Intron Struktur, wie KYP aufwies (Springer et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SU(VAR)3-9 homologe Gen *SUVH2* und die Gene *SUVH1*, *SUVH3*, *SUVH4* (*KYP*) und *OsSET1* konnten im Kern lokalisiert werden. Das Gen *SUVH2* wurde in allen untersuchten Pflanzenorganen nachgewiesen, genau wie *SUVH1*. Das Transkript *SUVH3* konnte in den Schoten nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die SUVH-Proteine zwar ähnliche Funktionen haben, aber diese durch räumliche und/oder durch zeitliche Unterschiede getrennt sind.

Es wurde in *Nicotiana tabacum* von Shen et al. 2001 das SET-Domänen Protein NtSET1 identifiziert. Das Protein NtSET1 enthält eine C-SET/SET-Domäne mit starker Homologie zu den Proteinen Clr4p und SU(VAR)3-9 (Shen et al., 2001; Yu et al., 2004).

Für die C-SET-Domäne konnte eine Interaktion mit dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (AdoMet) nachgewiesen werden, welcher den Transfer einer Methyl-Gruppe zum Lysine katalysiert (Bottomley, 2004).

Bei Überexpression von NtSET1 wurde, wie in den Linien *35S\*::mycSUVH2#5*, #6 und #22, eine Inhibierung des Wachstums festgestellt (Shen et al., 2001; Shen et al., 2004; Naumann et al., 2005). Die Linien *35S\*::mycSUVH2#5*, #6 und #22 zeigten neben der Reduktion des Wachstums auch eine verkleinerte Grundrosette und kürzere Schoten als der Wildtyp. Ihre Keimlinge wiesen *curled* Kotyledonen auf. Die Reduktion des Wachstums durch NtSET1 erfolgt durch eine verminderte Zellzahl und durch eine Reduktion der Zellgröße (Shen et al., 2004).

#### **4.2 Der Einfluss von SUVH-Proteinen auf die Ausprägung von Heterochromatin**

In *Arabidopsis* erfolgte der Nachweis einer erhöhten Transkriptmenge von *SUVH2* in den Linien mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp. Die Transkription der Gene *SUVH3-SUVH5* und *SUVH7-SUVH9* blieb unverändert. Für die Gene *SUVH1* und *SUVH6* wurde eine leicht erhöhte Expression gezeigt. Über diese Gene ist noch wenig bekannt, so konnte zum Beispiel für das Protein SUVH6 eine H3K9 HMTase Aktivität nachgewiesen werden (Jackson et al., 2004; Ebbs et al., 2005).

In den Linien *35S\*::mycSUVH2* mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp konnte eine erhöhte Menge an Heterochromatin und eine erhöhte DNA-Methylierung gezeigt werden (Naumann et al. 2005). Diese Linien zeigten eine erhöhte Methylierung für die heterochromatischen Histonmodifikationen Mono-H3K9, Di-H3K9, Mono-H3K27, Di-H3K27 und Mono-H4K20. Im Vergleich zum Wildtyp wurden in immunozytologischen Analysen für die euchromatischen Modifikationen Dimethyl-H3K4, Trimethyl-H3K9, Trimethyl-H3K27, Dimethyl-H3K36 und Dimethyl-H4K20 eine Reduktion gezeigt (Naumann et al. 2005).

Die Antisenselinien und die *svh2* SALK Linie, in denen kein *SUVH2*-Transkript nachgewiesen werden konnte, zeigten weder einen Phänotyp noch eine veränderte Expression der anderen *SUVH*-Gene. In diesen Pflanzen wurde eine Reduktion der heterochromatischen Histon-Methylierung Mono-H3K9, Di-H3K9, Mono-H3K27, Di-H3K27 und Mono-H4K20 gezeigt (A. Fischer, 2005).

In der Nullmutante *suvh2* konnte Herr A. Fischer eine Reduktion der heterochromatischen Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung zeigen.

Vor allem die Histonmethylierung Mono-H4K20 kann in der Mutante *suvh2* nicht nachgewiesen werden. Diese zytologischen Daten konnten durch Frau K. Irmeler in Western-Analysen bestätigt werden. Das SU(VAR)3-9 homologe Protein SUVH2 zeigt eine HMTase Funktion für die Histonmodifikationen H3K9 und H4K20. Diese multi-katalytische HMTase Aktivität wurde auch für den epigenetischen Aktivator Ash1 in *Drosophila* gezeigt, welcher zusätzlich noch die Position H3K4 methyliert (Beisel et al., 2002).

Für das *Drosophila* Protein SU(VAR)3-9 und seine homologen Proteine in Säugern konnte nur eine Methylierung an Histon H3K9 gezeigt werden. Die Methylierung von Histon H4K20 erfolgt durch das Protein SUV4-20. Das Protein SUV4-20h aus der Maus vermittelt die Histon H4K20-Trimethylierung am perizentromeren Heterochromatin (Schotta et al. 2004).

Für spezifische Loci konnte eine direkte Interaktion von SU(VAR)3-9 mit dem Protein HP1 gezeigt werden (Schotta et al. 2002, Greil et al., 2003). Das Protein HP1 ist mit Heterochromatin assoziiert und bindet direkt an dimethylierten H3K9 (Bannister et al. 2001, Lachner et al. 2001).

Das *Arabidopsis* Protein LHP1 (TFL2) ist ein homologes Protein des *Drosophila* Proteins HP1. In Tabak konnte eine Interaktion zwischen dem SU(VAR)3-9 homologen Protein NtSET1 und dem Protein LHP1 über *two-hybrid*- und *pull-down* Assay nachgewiesen werden (Yu et al., 2004). Der Nachweis der Kolo-kalisierung der beiden Proteine am dimethylierten H3K9 erfolgte über den Reporter YFP (Yu et al. 2004). Die Funktion von LHP1 ist die Repression der Genexpression von einigen Blütengen (Kotake et al. 2003). In *Arabidopsis* wurde mit dem Affymetrix GeneChip keine Änderung der Expression von *LHP1* (TFL2) in Pflanzen mit erhöhter oder verminderter *SUVH2*-Menge nachgewiesen.

In Säugetieren wurde zwischen dem Komplex SUV39H-HP1 und den CpG DNA-Methyltransferasen Dnmt3a (Bachmann et al., 2001) und Dnmt1 (Fuks et al., 2000) eine Verbindung gezeigt. Dnmt3a und Dnmt1 binden direkt an HP1 $\beta$  und an die HMTase SUVH39H. Es wurde eine direkte Verbindung zwischen den verantwortlichen Enzymen für DNA-Methylierung und Histon-Methylierung gezeigt (Fuks et al., 2003).

Die HMTase SUV39h ist notwendig für die direkte Histon H3K9-Trimethylierung und die Dnmt3a/Dnmt1-abhängige DNA-Methylierung in den perizentrischen *Repeats*. Die DNA-Methylierung der zentromeren *Repeats* scheint unabhängig von SUV39h zu sein (Lehnerts et al. 2003).

In den SUVH2 transgenen Pflanzen wurden ebenfalls Untersuchungen mit DNA modifizierenden Proteinen durchgeführt. Mittels semiquantitativer RT-PCR erfolgte in den Überexpressionslinien der Nachweis, dass *MET1* und *DDM1* erhöht expremiert werden. In den SUVH2 Antisenselinien wurden *MET1* und *DDM1* dagegen reduziert expremiert. Eine Veränderung der Trankriptmenge von *MET1* und *DDM1* wurde auch in den Affymetrix-cDNA Expressionschip festgestellt. Beide Proteine sind für das SUVH2-induzierte *Silencing* notwendig (Naumann et al., 2005). In der Kreuzung *ddm1-2* x *35S\*::mycSUVH2#6* erfolgte eine Suppression des „mini-Pflanzen“-Phänotyps. Diese Suppression des Phänotyps korrelierte mit der Abnahme der Histon-Methylierung für die Positionen Di-H3K9 und Mono-H4K20. In den Nachkommen *ddm1-2* x *35S\*::mycSUVH2#6* erfolgte auch eine Reduktion der DNA-Methylierung.

Für die untersuchten Linien *35S\*::mycSUVH2#6*, *35S\*::SUVH2as#11* und *suvh2* wurde keine Veränderung der *CMT3* Transkriptmenge festgestellt. Das SUVH2-induzierte *Silencing* ist unabhängig von der CpNpG DNA-Methyltransferase CMT3 (Naumann et al., 2005).

### **4.3 SUVH2-abhängige Änderungen der Expression von SET-Domänen Proteine in *Arabidopsis thaliana***

Mit Hilfe des cDNA Expressionschips der Firma Affymetrix wurde in den Linien *35S\*::mycSUVH2#5*, *35S\*::SUVH2as#21* und *suvh2* eine genomweite Änderung der Expression gezeigt (Anhang 5.4, Anhang 5.6.1 bis 5.6.3). *SUVH2* wurde in den Pflanzen mit „mini-Pflanzen“ Phänotyp 17 bis 21 mal stärker expremiert als im Wildtyp. In einigen homozygoten Antisenselinien und der *suvh2* SALK Linie konnte kein *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden.

Eine Expressionsanalyse der SET-Domänen Proteine ergab eine Veränderung der Transkriptmenge für *ASHH1* und *EZAI* (*SWN*). In der Linie *35S\*::mycSUVH2#5* wurde eine reduzierte Trankription von *ASHH1* gefunden.

Der epigenetische Aktivator ASH1 ist eine HMTase, welche nicht nur die Histonmethylierung H3K4, sondern für spezifische Loci auch die Histonmethylierung für H3K9 und H4K20 katalysiert (Beisel et al. 2002, Byrd et al. 2003).

Byrd et al. (2003) isolierte eine Mutante *ash1*, in welcher keine Histon H3K4-Methylierung nachgewiesen werden konnte. Der Verlust der H3K4-Methylierung deutet darauf hin, dass ASH1 für diese Histonmodifikation notwendig ist. ASH1 aktiviert die Transkription von *ULTRABITHORAX* in *Drosophila*.

Das Protein ASH1 ist eine Mitglied der TRX-Gruppe und ist direkt an die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Aktivität von homeotischen Genen beteiligt (Beisel et al., 2002). Die TRITHORAX homologen Proteine in Arabidopsis ATX und ATXR, welche für transkriptionell aktive Bereiche stehen (Alvarez-Venegas et al., 2003; Alvarez-Venegas et al., 2005), wiesen keine Expressionsänderung in den transgenen Linien auf.

Die Expression der Polycomb-Gruppen Proteine CLF und MEA blieben in den Linien *35S\*::mycSUVH#5*, *35S\*::SUVH2as#21* und *suvh2* unverändert. Die Expression von *EZA1* (*SWN*) wurde in der Überexpressionslinie *35S\*::mycSUVH2#5* reduziert, während die Expression in der Antisenselinie #21 und in der SALK Linie *suvh2* erhöht wurde.

Für das *Drosophila* Protein E(Z) und seine homologen Proteine wurde vor allen eine HMTase Funktion für die Histon-Methylierung H3K27 mit geringerer Affinität für Histon H3K9 festgestellt (Cao et al. 2004, Czermin et al. 2002, Kuzmichev et al. 2002, Muller et al. 2002).

Die E(Z) homologen Proteine in Arabidopsis sind CLF, MEA und EZA1 (Baumbusch et al., 2001).

Die Proteine CLF, MEA und EZA1 aus *Arabidopsis* bilden unterschiedliche Komplexe, wobei sie alle mit dem POLYCOMB Protein FIE (*FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM*) interagieren.

Der Komplex FIS2 (*FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM*)/MEA/FIE/MSI1 (*MULTICOPY SUPPRESSOR of IRA1*) ist verantwortlich für die korrekte Initiation und das Fortschreiten der Samenentwicklung (Köhler et al., 2003; Chanvivattana et al., 2004). Neben dem Einfluss auf die Samenentwicklung wurde für den Komplex MEA/FIE eine direkte Bindung am PHE1-Promotor (*PHERES1*) nachgewiesen. Das Protein PHE1 kodiert ein MADS-Box Transkriptionsfaktor. Die direkte Bindung von MEA und FIE am PHE1-Promotor wurde in einer Chromatin Immuno Präzipitation (ChIP) gezeigt (Autran et al., 2005).

Der Komplex FIS2/MEA/FIE/MSI1 ist homolog zu den *Drosophila* PRC2-Proteinen (*Polycomb Repressive Complex 2*) E(Z), Suppressor of zeste 12 [Su(z)12], Extra sex combs (Esc) und P55 (Grossniklaus et al., 1998; Kiyosue et al., 1999; Kohler et al., 2003; Luo et al., 1999; Ohad et al., 1999).

Die Proteine CLF, EMBRYONIC FLOWERING 2 (EMF2, Yoshida et al., 2001) und FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE, Kinoshita et al., 2001) gehören zu dem POLYCOMB Gruppen Proteinen und haben einen Effekt auf die Blüteninduktion in *Arabidopsis*. Für den Komplex FIE/CLF/EMF2 (EMBRYONIC FLOWER2) stellt *AGAMOUS* das Zielgen dar (Hsieh et al. 2003).

Das Protein CLF interagiert auch mit VERNALIZATION2 (VRN2). Das Protein VRN2 wird benötigt für Kälte induzierte Repression von *FLC* (FLOWERING LOCUS C). Die Proteine VRN2, FIS2 und EMF2 kodieren Proteine mit Homologie zum *Drosophila* Su(z)12 (Gendall et al., 2001).

Die Reduktion der Expression von EZA1 (SWN) in der Linie *35S\*::mycSUVH2#5* führt zu keinen Veränderungen, da es wahrscheinlich durch CLF kompensiert wird.

Das E(Z) homologe Protein EZA1 (SWN) interagiert wie CLF mit dem Proteinen FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM) und EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2). CLF und SWN haben nicht nur identische Interaktionspartner, beide zeigen auch ein ähnliches Expressionsmuster. Die *clf* Mutante weist dabei einen Phänotyp auf, während *swn* Mutanten keinen Phänotyp besitzen. In der Doppelmutante *clf/swn* wird der Phänotyp verstärkt (Chanvivattana et al., 2004). Die reduzierte Expression von SWN in *SUVH2* Überexpressionspflanzen führt zu keinen Veränderungen der Blüteninduktion und Blütenentwicklung.

#### **4.4 Das Silencing von Retrotransposons in *Arabidopsis***

Neben den Veränderungen der Expression von SET-Domänen Genen, wurde durch Überexpression von *SUVH2* eine große Anzahl von reduziert exprimierten Genen aus verschiedenen Bereichen gefunden. Eine dieser Gruppen stellen die transponiblen Elemente dar. In den Überexpressionslinien *35S\*::mycSUVH2#5* und *#6* wurde eine reduzierte Expression von mehreren *ATHILA* Transkripten gefunden.

Das Retrotransposon *Athila* ist ein degeneriertes Retroelement (Wright et al., 2001). Es gehört zum Typ der Ty3-Gypsy Retrotransposons und ist durch LTR-Sequenzen (*long terminal repeat*) begrenzt.

In *Athila* sind die viralen Proteine *env*, *pol* und *gag* enthalten (Marin et al 2000, Vicient et al. 2001). Das Protein *env* kodiert ein Transmembranprotein, das mit der Zellmembran assoziiert ist. Das virale *env* Protein interagiert mit zellulären Rezeptoren und vermittelt die Infektion. *Pol* kodiert für eine *Reverse Transkriptase*. Das Protein *gag* kodiert eine konservierte Domäne, die charakteristisch ist für das *nucleocapsid* Protein. *Gag* und *pol* werden in einem ORF transkribiert [*gag* Finger, Protease, Rev. Transkriptase, RnaseH, Integrase (Marco et al., 2005)]. Danach folgen nichtkodierende Bereiche und das Protein *env*. Das Retroelement *Athila* ist mit bis zu 200 Kopien im *Arabidopsis* Genom integriert (Burch et al., 2004).

Der Unterschied zwischen den verschiedenen *ATHILA* Kopien liegt im Grad ihrer Degenerierung, welcher die Möglichkeit bietet, sie in Gruppen zu gliedern. So enthalten die *Athila1*-, *Athila2*- und *Athila3*- Familien eine Deletion der *Reverse Transkriptase*. Die Familie *Athila4* gehört mit ca. 22 Mitgliedern zu der umfangreichsten Familie (Wright et al., 2001). In anderen Dikotyledonen wurden ähnliche Sequenzen gefunden, so wurden in der Erbse das Retrotransposon *Cyclops* (Vicient et al., 2001) und in Soja das Retrotransposon *Diaspora* (Yano et al. 2005; Marco et al., 2005) identifiziert.

In der Überexpressionslinie 35S\*S::mycSUVH2#5 betrifft die reduzierte Expression unterschiedliche *ATHILA* Gruppen, dazu gehören *ATHILA1*, *ATHILA5* und *ATHILA6*. Für das Retrotransposon *ATHILA* wurde in der Linie 35S\*S::mycSUVH2#5 mittels Bisulfid Sequenzierung eine erhöhte Methylierung der DNA in allen Motiven nachgewiesen, vor allen aber für die Methylierung im asymmetrischen Motiv (Naumann et al. 2005). *SUVH2* Überexpression hat nicht nur Einfluss auf die Expression von *ATHILA*, sondern es konnte auch eine reduzierte Expression für die Transposons *DEL1*, *PttA*, *TA1-1* und *EN/SPM* nachgewiesen werden. Die Expression des DNA Transposons *AC* blieb unverändert. Dies deutet darauf hin, dass *SUVH2* beim *Silencing* von Transposons beteiligt ist. Über das *Silencing* von Transposons wurde eine Reihe von Daten gesammelt.

Die DNA-Methyltransferase (*met1*), die *Chromatin-Remodeling*-ATPase (*ddm1*), die HDA6 Mutante (*sill*), die Histon H3K9-Methyltransferase KRYPTONITE und die CpNpG Methyltransferase CHROMOMETHYLASE3 spielen eine Rolle bei der Methylierung von Transposons, der Transkription und der Histonmethylierung von H3K9 (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002; Tariq et al., 2003).

Für das Retrotransposon TA3 (AtCOPIA44) konnte in der Mutante *cmt3* eine Reaktivierung gezeigt werden (Johnson et al., 2002).

Die Retrotransposons der Gypsy-Klasse zeigen keine Änderung in ihrer Aktivität und die DNA Transposon zeigen nur schwache Effekte. Zwischen der HMTase SUVH2 und der DNA-Methyltransferase CMT3 wurde keine Interaktion nachgewiesen, dagegen konnte eine Beziehung zwischen CMT3 und KYP gezeigt werden (Jackson et al., 2000; Lindroth et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass in *kyp* Mutanten das Retrotransposon TA3 ebenfalls reaktiviert wird, da der *Silencing*-Komplex inaktiviert vorliegt.

Die Retroelemente AtLANTYIS2 und AtENSPM2 (degenerierte AtCOPIA und VANDAL Elemente Ta2, At4g03870) wurden in der Nullmutante *met1*, welche eine drastische Reduktion an Histon H3meK9-Methylierung zeigen, reaktiviert. Die CpG-Methylierung der DNA wird für die HMTase-Aktivität an diesen *Loci* benötigt (Tariq et al. 2003).

Kürzlich wurde in Arabidopsis gezeigt das hypermethylierte DNA im symmetrischen Motiv CpG die Histon H3K27-Trimethylierung, welche in Euchromatin gefunden wurde, verhindert (Mathieu et al., 2005). Die heterochromatischen Modifikationen Monomethyl-H3K27 und Dimethyl-H3K27 dagegen sind nach Mathieu et al. (2005) unabhängig von der DNA-Methylierung.

Es wird spekuliert, dass die Proteine MET1, DDM1, und HDA6 zusammen einen Komplex bilden (Lippman et al. 2003). Zwischen SUVH2 und den Proteinen DDM1 und MET1 konnte eine Beeinflussung nachgewiesen werden. Die Interaktion der Linie 35S\*::*mycSUVH2#6* mit dem Allel *ddm1-2* (Vongs et al. 1993) führte zu einer Repression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps. Des weiteren konnte Herr I. Hofmann (persönliche Mitteilung) eine Interaktion zwischen SUVH2 und HDA6 zeigen. So wurde durch ein Allel von HDA6 eine Suppression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps gezeigt. Des weiteren wurde durch das HDA6 Allel *sill* eine erhöhte Histon-Methylierung verhindert, da die Mutante nicht in der Lage ist, die Lysine des Histons H3 zu deazetylieren (Lippmann et al., 2003).



Für den *Silencing*-Komplex MET1/ DDM1/SIL1 könnte die HMTase SUVH2 der fehlende Interaktionspartner für spezifische *Loci* darstellen. Zu diesen *Loci* gehören z. Bsp. die Transposons *ATHILA*, *DEL1*, *PttA* und *TAI-1*. Für das Transposon AC (Jarvis et al., 1997) sollte eine andere HMTase als SUVH2 eine Rolle spielen.

#### **4.5. Dosisabhängiger Effekt von SUVH2 auf *Transgene Silencing***

Neben der genomweiten Expressionsänderung einer Vielzahl unterschiedlicher Gene wurde auch der Einfluss von SUVH2 auf die Aktivität anderer T-DNA's untersucht.

Bei Überexpression von SUVH2 erfolgte eine stärkere Inaktivierung der LUZIFERASE, während in der Antisenselinie eine erhöhte Aktivierung zu beobachten war. Dieses verstärkte *Silencing* wurde in den Generationen BC1, F2 und F3 stabil weiter vererbt. Die Reduktion des endogenen *SUVH2*-Transkriptes führte zu einer höheren Aktivität der LUZIFERASE, dies blieb in der BC1-Generation und in den Generationen F2 und F3 stabil.

SUVH2 hat einen Dosis abhängigen Effekt auf das *Transcriptional Gene Silencing*. Der SUVH2 abhängige Effekt wurde stabil in die nächste Generation vererbt. Bei diesen Prozeß handelt es sich um *Imprinting*. Der Mechanismus, der dem zugrunde liegt, ist eine spezifische epigenetische Modifikation, die zu einer Stilllegung des Gens (*LUZIFERASE*) führt. Durch Herr S. Phalke konnte in der Überexpressionslinie eine erhöhte DNA-Methylierung in symmetrischen und asymmetrischen Motiven der *LUC*-Sequenz nachweisen.

In der Antisenselinie wurde eine reduzierte DNA-Methylierung gezeigt. Die Stärke der Methylierung des Gens *LUZIFERASE* steht im direkten Zusammenhang mit dessen Aktivität (Naumann et al., 2005). Der SUVH2 Dosis abhängige Effekt auf die Aktivität der Luciferase wurde stabil in die nächste Generation, trotz Abwesenheit der T-DNA, weitervererbt.

Bei diesem Prozess handelt es sich um *Imprinting*, wobei die veränderte Methylierung der *LUZIFERASE* auf die nächste Generation übertragen wurde.

*Imprinting* wurde in verschiedenen Organismen gefunden, in der Maus sind etwa 60 solcher Gene gekannt. *Imprinting* Gene werden häufig in chromosomalen Clustern gefunden. Sie zeigen eine unterschiedliche DNA-Methylierung in ihren Konrollregionen (Reik et al., 2001). Exprimierte Allele von *imprinting* Genen sind hyperazetyliert in H3 und H4, während stillgelegte Gene hypoazetyliert vorliegen (Li et al., 2001; Gehring et al., 2004). Polycomb-Gruppen Komplexe sind beteiligt am *Imprinting*.

Die Mutation des Polycomb Gruppengens *Embryonic ectoderm development* (Eed; das Maus Homolog zu Arabidopsis FIE) führt zu einer Reaktivierung des inaktiven X-Chromosoms (Wang et al., 2001) und den Verlust von *imprinting* des autosomal, paternal stillgelegten Gens (Mager et al., 2003).

In Arabidopsis wurde für das Polycomb Gruppen Protein MEDEA *Imprinting* nachgewiesen, wobei das Arabidopsis Protein DEMETER (DME, DNA Glykosylase), dass maternale Allel des stillgelegten *MEDEA* (*MEA*) Gens im Endosperm aktiviert (Choi et al., 2004, Grossniklaus et al., 1998; Guitton et al. 2005). Des weiteren wurde erkannt, dass die Methyltransferase MET1 die Expression des maternalen *MEA* Allels suppremiert.

Dies erfolgt entweder durch direkte Methylierung des *MEA*-Promotors oder MET1 methyliert und suppremiert ein unbekanntes Gen, welches die maternale *MEA* Expression im femalen Gamtophyten aktiviert (Xiao et al., 2003, Autran et al., 2005). Das Imprinting von *MEA* wird durch die Antagonisten MET1 (Methyltransferase) und DME (DNA-Glycosylase) kontrolliert. Des weiteren wurde gezeigt, dass die Aufrechterhaltung der Repression am *MEA* Locus die zygotische Aktivität von DDM1 erfordert (Vielle-Calzada et al., 1999).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Imprinting nachgewiesen (Adams et al., 2000; Berger et al., 2003; Fransz et al., 2003; Gehring et al., 2004; Kankel et al., 2003).

#### **4.6 Charakterisierung von SU(VAR)3-9 homologen Proteine**

In Arabidopsis wurden mittels EMS-Mutagenese funktionelle Analysen der Domänen durchgeführt. Eine Reihe von Mutanten wurden isoliert, deren Mutation im transgenen SUVH2 liegen. Die Mutationen betrafen die gesamte Sequenz. Es wurden Mutationen in der YDG-Domäne, im N-Terminus vor der YDG-Domäne, N-SET-Domäne und in der SET-Domäne isoliert. Diese identifizierten Allele von SUVH2 zeigten eine Suppression des „mini-Pflanzen“ Phänotyps. Sie zeigten auch eine Reaktivierung von Sequenzen, welche in der Ausgangslinie 35S\*::mycSUVH2#5 stillgelegt wurde. Eine transkriptionelle Reaktivierung konnte für die Transposons Ta1-1 und Athila gezeigt werden.

Herr A. Fischer untersuchte die DNA-Methylierung (5-MeC) und die Histon-Methylierung (dime-H3K9; monome-H4K20) in diesen Allelen.

Diese Untersuchung erfolgte mittels immunozytologischer Analysen.

Die Allele, deren Mutationen im N-Terminus vor der YDG-Domäne, in der YDG-Domäne und vor der N-SET-Domäne liegen, zeigten im Vergleich zur Ausgangslinie *35S\*::mycSUVH2#5* eine reduzierte DNA-Methylierung und eine Reduktion der Histon H3K9- und H4K20-Methylierung.

Für Mutationen innerhalb der SET-Domäne konnte keine reduzierte DNA-Methylierung, sondern nur eine Reduktion der Histon H3K9- und H4K20-Methylierung nachgewiesen werden (Naumann et al. 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass der N-Terminus von SUVH2 für die Erkennung der Zielsequenzen wichtig ist, während die SET-Domäne für die HMTase Funktion von SUVH2 verantwortlich ist.

Die SUVH2 vermittelte DNA-Methylierung scheint der Histon-Methylierung voranzugehen (Naumann et al. 2005).

Für das aus Tabak identifizierte NtSET1-Protein konnte ebenfalls eine HMTase-Aktivität für das Histon H3 an den Positionen K9 und K27 nachgewiesen werden (Yu et al. 2004).

Für den N-Terminus (YDG/SRA-Domäne) von NtSET1 wurde eine Bindung in der Interphase an Chromatin nachgewiesen. Die C-SET- und die SET-Domäne sind wichtig für die Bindung des Proteins an spezifischen Kernregionen und für die Bindung an kondensierten mitotischen Chromosomen (Yu et al. 2004).

Seit einiger Zeit wird die Frage untersucht, „*What's first?*“. Es soll geklärt werden, ob die DNA-Methylierung die Histon-Methylierung beeinflusst oder umgekehrt. Die DNA-Methylierung ist beteiligt an eigenetischen Prozessen, wie X-Chromosom Inaktivierung, *Imprinting* und *Silencing* von Transposons.

Es wurden Beispiele gefunden, in denen die DNA-Methylierung durch die Histon-Methylierung beeinflusst wird (Tamaru et al., 2001; Tamaru et al., 2003; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002; Lindroth et al., 2004). In *Neurospora crassa* konnte an einer Mutante der Histonmethyltransferase *dim-5* (*defective in methylation*) gezeigt werden, dass die DNA Methylierung abhängig ist von der Histonmethylierung (Tamaru et al., 2001; Tamaru et al., 2003). In *Arabidopsis* erfolgte der Nachweis, dass die CpNpG Methylierung von CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) kontrolliert wird von der Histon H3K9-Methylierung durch KRYPTONITE (KYP=SUVH4; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002; Lindroth et al.; 2004).

Es wurden auch Beispiele gefunden, die zeigten, dass die DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Histonmethylierung hat (Johnson et al., 2002; Soppe et al., 2002; Tariq et al. 2003).

In Arabidopsis *met1* Mutanten wurde eine reduzierte Methylierung für das Motiv CpG gefunden. Diese reduzierte DNA-Methylierung beeinflusst die Histon-Methylierung H3K9 (Tariq et al., 2003). Eine Reduktion der Methylierung von H3K9 wurde durch ChIP (*Chromatin Immuno Precipitation*)-Analysen in *ddm1* und in *met1* Mutanten festgestellt (Johnson et al., 2002).

Des Weiteren fanden Soppe et al. (2002) in den Mutanten *met1* und *ddm1* ein reduziertes H3K9 Methylierungssignal an den Chromozentren.

#### **4.7 Einfluss von SUVH2 auf die Expression der Resistenzgene**

Neben dem Einfluss von SUVH2 auf die Expression von Transposons wurde die Änderung der Expression von Resistenzgenen untersucht.

Die Pflanze versucht mit Hilfe ihrer Resistenzgene der Infektion entgegen zu wirken (Baker et al., 1997; Diaz-Pendon et al., 2004). Durch Überexpression von SUVH2 kommt es zu einer Expressionsänderung, wobei Resistenzgene sowohl *down*- als auch *up*-reguliert wurden (Cooper et al. 2001, Whitman et al 2003).

In der Linie *35S\*::mycSUVH2#5* wurden insgesamt 33 *Down*-regulierte Gene identifiziert, welche bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (Anhang 5.6.3). Dagegen wurden nur 9 Gene gefunden, welche in der Linie *35S\*::mycSUVH2#5* stärker exprimiert wurden als im Wildtyp (Anhang 5.6.3).

Es wurde eine reduzierte Expression für RPS4 identifiziert. Das Arabidopsis Protein RPS4 gehört zu der Klasse der *Toll/interleukin-1receptor/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat (TIR-NB-LRR)* Resistenz Gene (R).

Eine transiente Expression von *35S::RPS4* induziert in Tabakblättern eine *AvrRps4*-abhängige *hypersensitive response* (HR). In Deletion-Analysen der RPS4-Domänen wurde gezeigt, dass die TIR-Domäne für die Ausprägung der HR-Phänotypen benötigt wird (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der durch *RPS4* Expression resultierende Zelltod abhängig ist von den 3 Signalkomponenten EDS1, SGT1 und HSP90.

Zu den supprimierten Genen gehörten neben *RPS4* auch *EDS1*, *RPP1-WsC*, *Hcr9-9A*, *RPP5*, *Cf-2.1* und *Hcr2- 5b*. Das Protein EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*), welches bei Pathogen Abwehrprozessen eine Rolle spielt, hat eine Funktion als Triacylglycerol-Acyl-Hydrolase.

Es ist beteiligt an Salizylsäure vermittelten Abwehrprozessen der Pathogene in *Arabidopsis*. EDS1 wird gemeinsam mit den Proteinen SGT1 und HSP90 benötigt bei der AvrRps4-abhängigen HR, welche durch die Expression von RPS4 induziert wird ((Mindrinos et al., 1994; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Das Protein EDS1 wird benötigt für Expression der TIR-NBS-LRR Proteine, welche für die Induktion der Resistenz notwendig sind.

Das *Arabidopsis* Protein RPP1-WsC gehört ebenfalls zu der TIR-NBS-LRR Resistenzklasse und wird in einem Resistenzcluster auf Chromosome 3 kodiert.

In diesem Bereich liegen folgende Resistenz Gene *RPP1-WsA*, *RPP1-WsB* und *RPP1-WsC* (Botella et al., 1998; Shirano et al. 2002).

Das suppressierte *Arabidopsis* Protein RPP5 gehört ebenfalls zur TIR-NBS-LRR Resistenzklasse. Das Protein RPP5 erkennt nicht nur *Peronospora parasitica* Noco2, sondern auch *P. parasitica* Emoy2 und Emwa1 (van der Biezen et al., 2002).

Das suppressierte Gen *Hcr9-9A* erkennt verschiedene Elicitoren und schützt reife Pflanzen vor Infektionen. Neben HCR9-9A gehören auch die Proteine HCR9-9B, HCR9-9D, und HCR9-9E zu dieser Gruppe. Die HCR9 Gruppe ist auch unter der Bezeichnung Cf-9 zu finden (Panter et al., 2002). Das *Arabidopsis* Protein Cf-9 erkennt das pathogen kodierte Peptide Avr9 (Jones et al., 1998; Tör et al., 2004). Zu dieser Gruppe gehören neben Cf-9 auch Cf-2, Cf-4 und Cf-5. Sie sind verantwortlich für die Resistenz gegen das *Cladosporium fulvum* (Avr2, Avr4, Avr5; Thomas et al., 1998; Dixon et al., 2000).

Neben *down*-regulierten Genen wurden auch einige Gene stärker exprimiert als im Wildtyp. Zu diesen Genen gehören die Proteine *Pathogenesis-related* (PR)-5 und (PR)-1. Die Pflanzen akkumulieren eine große Anzahl von *Pathogenesis-related* (PR) Proteinen, wenn diese mit Krankheitserregern wie Bakterien, Pilze und Viren konfrontiert werden (Hu et al., 1997). Die Akkumulationen dieser Proteine korreliert mit der Entwicklung der systemischen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR; Riechmann et al., 1992; Wang et al., 2005). Die *systemic acquired resistance* (SAR) wurde etabliert als Ergebnis der NPR1 (*Nonexpressor of pathogenesis related (PR) genes 1*) -regulierten Expression von *pathogenesis-related* (PR) Genen.

Eine erhöhte Expression dieser Gene ist essentiell für die SAR-Reaktion der Pflanze (Wang et al., 2005).

Die evolutionär konservierten PR-Proteine können in 5 Gruppen untergliedert werden.

Die PR1-Familie enthält meist saure Proteine, während die Familien PR2 und PR3 oft die Funktionen von Glucanasen und Chitinasen aufweisen und somit eine antifungale Aktivität besitzen (Hu et al., 1997). Die Mitglieder der Familie PR4 sind saure Proteine, sie haben eine antifungale Aktivität und handeln gemeinsam mit den PR2 und PR3 Proteinen. Die *Pathogenesis-related* (PR)-5 Proteine sind eine Familie von Proteinen, welche durch eine Vielzahl von Phytopathogenen in vielen Pflanzen induziert werden. Sie weisen eine Sequenzähnlichkeit mit Thaumatin auf (Hu et al., 1997).

Mitglieder der PR5-Gruppe wurden in *Arabidopsis* nach einer Infektion mit dem Virus *TMV* (*tobacco mosaic virus*), *Pseudomonas syringae* oder nach Behandlung mit 2,6-Dichloroisonikotinsäure (INA) oder Salizylsäure (SA) identifiziert (Hu et al., 1997; Peng et al., 2005).

In der Überexpressionslinie *35S\*::mycSUVH2#5* wurden die Gene *PR1* und *PR5* stärker expremiert als im Wildtyp. Whitman et al. (2003) untersuchte die Änderung der Expression in *Arabidopsis* nach einer Virusinfektion mit den Viren *TVCV*, *ORMV*, *PVX*, *CMV* und *TuMV*. Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR (QRT-PCR) konnte ein Induktion von Genen der Pathogenabwehr nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 114 unikale Gene identifiziert, die in allen Virus infizierten Pflanzen hoch reguliert waren. 35 von diesen Genen sind mit der Stressantwort assoziiert oder regulieren diese. Des weiteren wurde die Expression von HSP Proteinen induziert.

#### **4.8 Interaktion zwischen SUVH2 und dem Virus *TuMV***

Nach der Untersuchung der Expressionsänderung einiger Resistenzgene in der Überexpressionslinie wurden die Veränderungen in der Expression von *SUVH*-Genen, während einer Virusinfektion mit *TuMV* untersucht.

Das Virus *TuMV* gehört wie die Mehrheit der Pflanzen infizierenden Viren zu den RNA-Viren. Diese replizieren sich zunächst und es folgt eine Vermehrung von Zelle zu Zelle und schließlich werden benachbarte Pflanzen infiziert. Für diesen Prozeß werden vom Virus Wirtsfaktoren induziert, welche für die Replikation, die Vermehrung, die Bewegung und die Suppression der Wirtsabwehr notwendig sind. Dieser Mechanismus dient der Vermehrung des Virus.

Der RNA Potyvirus *TuMV* (*Turnip Mosaic Virus*) ist in der Lage, Kreuzblütler zu infizieren.

Aus einer Infektion der Pflanze mit *TuMV* resultieren verschiedene Symptome, wie die Ausprägung des Blattmosaics und die Ausbildung von Nekrosen (Kaneko et al., 2004).

Für den Ökotyp Col-0 (Columbia) wurde eine Entwicklung des Mosaic Symptoms nach TuMV Infektion identifiziert. Eine nekrotische Entwicklung erfolgt bei einer *TuMV* Infektion des Ökotyps Ler (*Landsberg erecta*). Die nekrotischen Symptome werden durch das dominante Gen TuNI (*TuMV necrosis inducer*; Kaneko et al., 2004) induziert.

Die P3 kodierende Region ist verantwortlich für die systemische Infektion und für ihre Symptome (Swaney et al., 1995; Moreno et al., 1998; Sanchez et al., 1998; Johansen et al., 2001). Des weiteren interagiert P3 mit dem viralen P1 Protein und mit dem viralen Proteinen des putativen Replikationskomplexes, der RNA-Helikase und dem VPg-Protein (viral protein genom linked; Guo et al., 1997; Dunoyer et al., 2004). P1 und P3 sind in der Phase der Virus Replikation und während der Ansammlungsphase, wenn keine strukturellen Proteine gebildet werden, aktiv. Sie sind an der Virus Vermehrung beteiligt. In Tabak wurden P1 und P3 Transgen exprimiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Keimlinge der P3 transgenen Linien in ihrer Entwicklung gehemmt waren. Dies ist ein Hinweis für den schädlichen Effekt von P3 in der Pflanze (Moreno et al., 1998). Infizierte Pflanzen sind steril oder zeigen eine reduzierte Fertilität (Lellis et al 2002). Der *Turnip mosaic virus* bindet das virale Protein (*virus genome-linked protein, VPg*) an den pflanzlichen Initiationsfaktor *eIFiso4E* und inhibiert die Expression der Wirtsgene. Die Expression der Wirtsgene, Aktin und Tubulin ist während der Virus Replikationsphase nicht verändert. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Virus für seine Translokation in der Zelle und zwischen den Zellen das Zytoskelet nutzt (Maule et al 2002).

Nach einer *TuMV*-Infektion des Wildtyps und der *suvh2* Nullmutante wurde zunächst das virale Transkript P3 nachgewiesen. Danach erfolgte der Nachweis der Transkripte *SUVH1-SUVH9*, wobei besonders auf Expressionsunterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Material geachtet wurde. In den *TuMV*-infizierten Wildtypproben wurde eine eindeutig erhöhte Transkriptmenge für *SUVH2* gezeigt. Die Transkripte der Kontrollgene *18SrDNA*, *Aktin* und die Transkripte von *SUVH1* und *SUVH3-SUVH9* zeigten keine Expressionsänderung aufgrund der Virusinfektion.

In der Mutante *suvh2* konnte in keiner Probe das Transkript von *SUVH2* nachgewiesen werden. Das *SUVH3* Transkript lag in den virus-infizierten Proben leicht erhöht vor. Das *SUVH4* zeigte eine stärkere Erhöhung der Expression als *SUVH3*. *SUVH4* scheint in der *suvh2* Nullmutante die Funktion des Gens *SUVH2* zu kompensieren.

*SUVH2* ist an Abwehrprozessen beteiligt, dies ist an einer deutlichen Induktion von *SUVH2* bei einer Virusinfektion im Wildtyp zu sehen. In der Mutante *suvh2* wurde das fehlende *SUVH2*-Transkript durch die erhöhte Expression von *SUVH4* kompensiert.

#### **4.9. Zusammenfassung**

Gegenstand dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von SET-Domänen Genen in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia. Es wurden mittels einer Datenbanksichtung 10 homologe SU(VAR)3-9 Proteine identifiziert.

*AtSUVH2*, ein Mitglied dieser Gruppe wurde näher untersucht. Es ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, welches auf Chromosom 2 in der Nähe des Markers *ve015* lokalisiert wurde.

Für die Analyse von *SUVH2* wurden transgene Linien etabliert. In den Linien *35S\*::mycSUVH2#5*, #6 und #22 konnte eine erhöhte Menge an *SUVH2* Transkript nachgewiesen werden. Diese Überexpression von *SUVH2* führt zur Ausprägung von „*curled*“-Kotyledonen und „*curled*“-Blättern. Die Überexpressionslinien #5, #6 und #22 sind durch ein vermindertes Wachstum gekennzeichnet, dieser Phänotyp wurde als "mini-Pflanzen" bezeichnet. Die *suvh2* Mutante und die *SUVH2* Antisenselinien weisen keinen Phänotyp auf. In diesen transgenen Linien wurde der Einfluss von *SUVH2* auf die genomweite Expression untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf den Effekt der Überexpression von *SUVH2* gelegt. In der Überexpressionslinie *35S\*::mycSUVH2#5* kommt es zu einer genomweiten reduzierten Expression verschiedener Transposons (*ATHILA*, *En/Spm*, *PttA*) und Genen der Pathogenabwehr (*RPP1*, *RPP5*, *EDS1*, *Hcr9-9*). Für einige Gene konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden. In diese Gruppe gehören die *Pathogenesis related* Proteine *PR1* und *PR5*.

Das *SUVH2* hat einen Dosis-abhängigen Effekt auf das Transgen-Silencing (LUCIFERASE). Bei Überexpression von *SUVH2* erfolgt ein verstärktes Silencing der LUCIFERASE. In den Antisenselinien weist LUCIFERASE eine erhöhte Aktivität auf.

Der "mini-Pflanzen" Phänotyp wurde für die funktionelle Analyse der SET- und YDG-Domäne von *SUVH2* mittels EMS-Mutagenese genutzt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die SET-Domäne eine HMTase-Aktivität für die Histone H3K9, H3K27 und H4K20 hat. Der N-Terminus von *SUVH2* dient der Erkennung der Targetsequenzen.



Es wurde die Expression der Gene SUVH1 bis SUVH9 während einer Virusinfektion mit dem Potyvirus TuMV (*Turnip Mosaic Virus*) analysiert, wobei während einer Infektion *SUVH2* stärker exprimiert wird.