

**Funktionelle Charakterisierung neuer SET-Domänenproteine
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

**Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Andreas Fischer
geb. am 20.05.1970 in Erfurt

Gutachter: 1. Prof. Dr. G. Reuter
2. Dr. habil. O. Mittelsten Scheid

verteidigt am 26.09.2005

Halle (Saale), den 15.10.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009271

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009271>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Eukaryotische Histon-und DNA-Modifizierungen.....	2
1.2 In <i>Arabidopsis thaliana</i> kodieren Genfamilien für E(Z), TRX, ASH1 und 3 SU(VAR)3-9 homologe SET-Domänenproteine.....	3
1.3 Zusammenspiel von DNA-und Histonmethylierung.....	6
1.4 Gegenstand der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Verwendete Materialien.....	11
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Lösungsmittel und Oligonukleotide.....	11
2.1.2 Mikroorganismen.....	11
2.1.3 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.4 Vektoren.....	12
2.1.5 Pflanzenmaterial.....	13
2.1.6 Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen.....	14
2.2 Molekulargenetische Methoden.....	14
2.2.1 Klonierung von Fusionskonstrukten.....	14
2.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	17
2.2.3 Klonierung von Fragmenten und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	18
2.2.5 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen.....	18
2.2.6 Isolation von pflanzlicher RNA.....	19
2.2.7 RT-PCR-Analysen.....	19
2.2.8 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden.....	20
2.2.9 Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.10 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.2.11 Plasmidtransformation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.2.12 Anzucht des Pflanzenmaterials.....	22
2.2.13 Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.14 Proteinextraktionen.....	23
2.2.15 Nachweis der Proteine im Westernblot.....	24
2.2.16 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	26

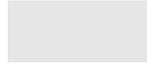
2.2.17	Histon-Methyltransferase Assay.....	26
2.2.18	DNA-Sequenzanalyse.....	27
2.2.19	Transiente Expression in Epidermiszellen von <i>Scilla</i> und <i>Allium</i>	27
2.2.20	Nachweis von β -Glucuronidase.....	28
2.2.21	Immunozytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern.....	28
2.2.22	Bisulfid-Sequenzanalyse.....	31
2.2.23	Bioinformatik.....	32
3.	Ergebnisse.....	33
3.1	Die Su(var)3-9 homologe Gene von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.2	Transiente Expressionssysteme und die Analyse der nukleären Verteilung von SUVH-Proteinen.....	36
3.3	Die SU(VAR)3-9 Homologen SUVH1 und SUVH2 sind Heterochromatin-assoziierte Proteine, Transgen-Analyse zur Heterochromatinbindung von SUVH-Proteinen.....	41
3.3.1	Überexpression von <i>Drosophila</i> HP1 in <i>Arabidopsis</i>	43
3.3.2	Expression von <i>Drosophila</i> SU(VAR)3-9 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.3.3	Überexpression von <i>SUVH1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.3.4	Ektopische Chromatinbindung nach Überexpression von <i>SUVH2</i>	51
3.4	Histon-Methyltransferaseaktivität von SUVH1 und SUVH2.....	54
3.4.1	<i>In vitro</i> -Analysen zur HMTase-Aktivität von SUVH1 und SUVH2.....	54
3.5	Differentielle Effekte von <i>SUVH1</i> , <i>SUVH2</i> und <i>SUVH4</i> -Nullmutanten auf heterochromatische Histon- und DNA-Methylierung.....	55
3.6	Ektopische Heterochromatisierung durch <i>SUVH2</i> -Überexpression.....	60
3.7	Differentielle Modifizierung der DNA-Methylierung durch Nullmutation und Überexpression von <i>SUVH2</i>	64
4.	Diskussion.....	71
4.1	Su(var)3-9 homologen Gene von <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
4.2	Organspezifische Expression und Funktion der <i>SUVH</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
4.3	Transiente Expressionssysteme und die Analyse der nukleären Verteilung von SUVH-Proteinen.....	74
4.4	Die Su(var)3-9 Homologen SUVH1 und SUVH2 sind Heterochromatin-assoziierte Proteine.....	76
4.5	Überexpression von <i>Drosophila</i> HP1 in <i>Arabidopsis</i>	76

4.6	Expression von <i>Drosophila</i> SU(VAR)3-9 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
4.7	Überexpression von SUVH1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
4.8	Ektopische Chromatinbindung nach Überexpression von <i>SUVH2</i>	79
4.9	Histon-Methyltransferaseaktivität von SUVH1 und SUVH2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ..	79
4.10	Differentielle Effekte der Nullmutanten von <i>SUVH1</i> , <i>SUVH2</i> und <i>SUVH4</i> auf ...	80
	heterochromatische Histon-und DNA-Methylierung	80
4.11	Ektopische Heterochromatisierung durch <i>SUVH2</i> -Überexpression	82
4.12	Differentielle Modifizierung der DNA-Methylierung durch Nullmutation und	
	Überexpression von <i>SUVH2</i>	83
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literatur	88
7.	Anhang.....	99
7.1	Herstellung der Fusionskonstrukte für transiente Assays.....	99
7.2	Konstruktion des binären Vektors pBI 1,4 t-myc	99
7.3	Etablierte bzw. verwendete Pflanzenlinien.....	100
7.4	Verwendete Primer	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Nukleotid	NP40	Nonident P40
Abb.	Abbildung	ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
Amp^r	Ampicillinresistenz	PBS	Phosphate Buffered Saline
AS	Aminosäure	PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
bp	Basenpaar	PEV	Positioneffektvariegation
BSA	Rinderserumalbumin	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
bzw.	beziehungsweise	pH	potentia Hydrogenii
C	Cytosin-Nukleotid	Poly-A	Polyadenylierung
C°	Grad Celsius	Q	Aminosäure Glutamin
ca.	zirka	R	Aminosäure Arginin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus	RNA	Ribonukleinsäure
cDNA	copy-DNA, doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA	RNase	Ribonuklease
C	Aminosäure Cystein	rRNA	ribosomale RNA
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins	Upm	Umdrehungen pro Minute
d. h.	das heißt	RT	Reverse Transkription
DMSO	Dimethylsulfoxid	s.	siehe
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SAM	S-Adenosyl-L-[methyl- ¹⁴ C]
DNase	Desoxyribonuklease	sec	Sekunden
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat	SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
DTT	Dithiothreitol	SET	Su(var)3-9 / Enhancer of Zeste / Trithorax
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SSC	Standard Saline Citrate
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	SU(VAR)	Suppressor of variegation
et al.	et alii; und andere	SUVH	SU(VAR)3-9-Homolog
F_(x)	Generation nach Kreuzung (Filialgeneration)	SUVR	SU(VAR)3-9-Related
g	Gramm	T	Aminosäure Threonin
G	Guanin-Nukleotid	T	Thymin-Nukleotid
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	Tab.	Tabelle
GST	Glutathion-S-Transferase	T-DNA	Transfer-DNA
GUS	<i>β-Glucuronidase</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
h	Stunden	TGS	Transcriptional Gene Silencing (Transkriptionelles Gen-Silencing)
HMTase	Histon-Methyltransferase	TMV	Tabakmosaikvirus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
H1	Histonprotein 1	T_(x)	Generation nach Transformation
H2	Histonprotein 2	U	<i>Units</i>
H3	Histonprotein 3	u.a.	unter anderem
H4	Histonprotein 4	UV	ultraviolett
Hyg^r	Hygromycinresistenz	W	Aminosäure Tryptophan
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid	w/v	Masse je Volumen
K	Aminosäure Lysin	WT	Wildtyp
Kan^r	Kanamycinresistenz	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid
Kap.	Kapitel	X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Glucuronid
kb	Kilobasenpaare	Y	Aminosäure Tyrosin
LacZα	α-Untereinheit der β-Galactosidase	z.B.	zum Beispiel
LB	Luria Bertani	z.T.	zum Teil
LUC	<i>Luciferase</i>		
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>		
mg	Milligramm		
min	Minuten		
mRNA	<i>messenger RNA</i>		
M&S	Murashige und Skoog		
N	Aminosäure Asparagin		
N	eines der Nucleotide A, C oder T		
N-terminal	Amino-Terminus eines Proteins		
OD_x	optische Dichte bei x nm		

PAA Polyacrylamid
p Phosphat



1. Einleitung

Die genetische Information eines Organismus ist auf der DNA kodiert. Die Verpackung dieser genetischen Information erfolgt auf engstem Raum im Zellkern in mehreren Strukturebenen. Dabei ist die DNA durch die Bindung der Histonproteine H1, H2A, H2B, H3 und H4 in eine komplexe Struktur, den Nukleosomen, kompaktiert. Diese Nukleosomen wiederum können durch Interaktion mit anderen Proteinen zu einer höhergeordneten Struktureinheit, dem Chromatin, konfiguriert werden.

Die Kontrolle dieser transkriptionsaktiven und –inaktiven Bereiche wird dabei direkt durch *cis*-DNA-Elemente, aber auch durch *trans*-wirkende Faktoren, sowie durch epigenetische Prozesse, welche letztendlich auf die Chromatinstruktur der Gene wirken, durchgeführt. Dabei sind solche epigenetischen Veränderungen der Chromatinstruktur zellerblich und können zu epigenetischem Silencing führen. So wurde mittlerweile auch die Modifizierung von DNA und Histonen, bei letzteren insbesondere der N-terminale Bereich, als der Schlüssel zum Verständnis epigenetischer Prozesse, wie Gen-Silencing und –aktivierung, erkannt. Als Silencing wird dabei die Inaktivierung von künstlich oder natürlich eingebrachten Transgenen sowie deren endogene Sequenzhomologe bezeichnet. Der Mechanismus für das Silencing ist sehr komplex. Die DNA-Sequenz des Zielgens wird dabei nicht verändert, sondern das Silencing wird durch einen epigenetischen Prozess bewirkt. Dabei kann auch lokal die Chromatinstruktur verändert werden, was durch DNA- und Histonmodifizierungen, wie z. B. Methylierungen, bewirkt werden kann. Hierzu konnten in den letzten Jahren eine große Anzahl von Enzymen identifiziert werden, welche diese DNA- und Histonstrukturen modifizieren, sowie Proteine, welche solche Modifizierungen spezifisch erkennen, daran binden und Silencing-Komplexe aufbauen.

Insbesondere auch nach der Sequenzierung des Genoms verschiedener Arten, beispielsweise der Eukaryoten *Drosophila melanogaster* als Vertreter tierischer und *Arabidopsis thaliana* als pflanzlicher Modellorganismus, wuchs die Anzahl und das Wissen über solche Enzyme und Proteine stetig an. Somit kann letztendlich eine Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen über solche epigenetische Regulationsmechanismen kontrolliert werden.

1.1 Eukaryotische Histon- und DNA-Modifizierungen

Die Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung der Lysin-, Arginin- und Serinreste von Histonen resultiert in einem bestimmten Muster, welches zur Formulierung der epigenetischen Histon-Code Hypothese führte (Stahl und Allis 2000; Jennuwein und Allis 2001). Dabei sind bei aktiven oder reprimierten Chromatin unterschiedliche Modifizierungen an den Aminosäureresten vorhanden.

Am Histon H3 definiert die Methylierung der Lysinreste 4, 36 und 79 aktives Chromatin, während die Methylierung der Lysinreste 9 und 27 bei H3 sowie 20 bei Histon H4 für reprimierte Chromatinbereiche spezifisch ist (Fischle et al., 2003; Lachner et al., 2003). Dabei wird durch die Mono-, Di- und Trimethylierung dieser Aminosäurepositionen das Spektrum des epigenetischen Histoncodes noch wesentlich erweitert. Eine Mono-, Di- und Trimethylierung von Histon H3 an der Position Lysin 9 und 27 sowie die Trimethylierung im Histon H4 an der Position Lysin 20 sind spezifische Histonmethylierungen für Heterochromatin von *Drosophila* (Ebert et al., 2004). Bei der Maus ist die Trimethylierung von Lysin 9 im Histon H3, von Lysin 20 im Histon H4 sowie die Monomethylierung von Lysin 27 im Histon H3 spezifisch für perizentrisches Heterochromatin. In dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* werden im Gegensatz dazu Trimethylierungen für Lysin 9 und 27 im Histon H3 und Di- sowie Trimethylierung von Lysin 20 im Histon H4 im Euchromatin gefunden, während Heterochromatin durch mono- und dimethyliertes Lysin 9 und 27 im Histon H3 sowie monomethyliertes Lysin 20 im Histon H4 charakterisiert wird (Naumann et al., 2005). Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass der Histoncode im Gegensatz zum DNA-Code nicht universell ist, sondern artspezifische Unterschiede existieren (Loidl, 2003).

Die Anzahl der histonmodifizierenden Enzyme in Pflanzen ist ungleich höher als in anderen Eukaryoten. Ihre Funktion bei der Methylierung der verschiedenen Aminosäureresten in den Histonen sowie das Zusammenspiel mit anderen Chromatinregulatoren ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Die Existenz für diese weitaus höhere Vielfalt von Histon- und DNA-modifizierenden Enzymen bei Pflanzen im Vergleich zu anderen Eukaryoten könnte verschiedene Ursachen haben. Die ontogenetische Entwicklung der Pflanzen ist, im Gegensatz zu den meisten Tieren, durch eine hohe Umweltabhängigkeit und Plastizität gekennzeichnet. Dies wird vor allem durch die fast

ausschließlich sessile Lebensform bedingt. Die Vielzahl äußerer Einflüsse wird wahrscheinlich durch ein breites Spektrum an Genexpressionsmustern, gesteuert durch eine große Zahl dafür verantwortlicher Enzyme und interagierender Proteine, widergespiegelt. Die Möglichkeit der Dedifferenzierung und Totipotenz pflanzlicher Zellen kann ebenfalls für eine flexible Antwort auf verschiedene Umwelteinflüsse notwendig sein. Die komplexe Steuerung dieser entwicklungsbiologischen Prozesse wird vor allem durch DNA- und Histonmodifizierungssysteme bewirkt, welche als Multigenfamilien in Pflanzen vorhanden sind. So wurden 12 putative methylcytosin-bindende Proteine (Zemach und Grafi, 2003), 29 SET-Domänenproteine (Baumbusch et al., 2001), 18 putative Histondeacetylasen und 12 putative Histonacetylasen (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000; Pandey et al., 2002) identifiziert, ungleich mehr als in tierischen Organismen.

Eine zentrale Rolle bei diesen Regulationsprozessen kommt der Etablierung epigenetisch stabiler Chromatinzustände zu. Hierbei ist die Lysinmethylierung der Histone H3 und H4 durch die enzymatische Aktivität der SET-Domänenproteine von entscheidender Bedeutung.

1.2 In *Arabidopsis thaliana* kodieren Genfamilien für E(Z), TRX, ASH1 und SU(VAR)3-9 homologe SET-Domänenproteine

Die Identifikation von SET-Domänenproteinen fand zuerst in *Drosophila melanogaster* statt. Hierbei wurde eine im carboxyterminalen Ende befindliche konservierte Domäne identifiziert, die außer in SU(VAR)3-9 auch in ENHANCER OF ZESTE (EZH) sowie TRITHORAX (TRX) gefunden wurde (Tschiersch et al., 1994; Jenuwein et al., 1998).

In *Arabidopsis* erfolgt die Einteilung der SET-Domänenproteine, in Anlehnung an die homologen Proteinfamilien in *Drosophila*, in vier Klassen. Dabei wurden bislang 29 Gene, welche für SET-Domänenproteine kodieren, identifiziert (Baumbusch et al., 2001). Die Gruppe der zuerst identifizierten *Enhancer of zeste E(z)* homologen SET-Domänengene in *Arabidopsis* umfasst 3 Mitglieder, *CURLY LEAF (CLF)*, *MEDEA (MEA)* und *SWINGER (SWN)*, ursprünglich *EZAI*). Die Funktion von E(Z) Proteinen wurde bereits in anderen Eukaryoten, vor allem in *Drosophila melanogaster* und *Mus musculus* (Jones und Gelbart, 1993; Laible et al., 1997; Laible et al., 1999) analysiert. Hierbei sind E(Z) Proteine in die chromatinabhängige Genregulation einbezogen. E(Z) wirkt in *Drosophila* sowohl als Polycomb-Gruppen Gen *Pc(G)*, als auch als Trithorax-

Gruppen Gen. Das Genprodukt der *Pc(G)* Gene ist dabei in die Repression der homeotischen *Antennapedia* und *Bithorax Complex* Gene, Genprodukte der Trithorax-Gruppengene in die Aufrechterhaltung der aktiven Expression dieser homeotischen Selektorgene involviert (LaJeunesse und Shearn, 1996). Mutationen für *E(z)* führen zu einem Suppressorphänotyp, bewirken also eine Dekondensierung von Chromatinstrukturen. Die tierischen Polycomb-Gruppen Proteine (Pc-G) interagieren zu einem *Polycomb Repressive Complex 1* und *2* (PRC1 und PRC2). PRC2 hat eine Histon-Methyltransferaseaktivität für die Lysinreste 9 und 27 von Histon H3. Die Methylierung von H3K9 und H3K27 bildet die Voraussetzung für die Bindung von Pc-G an Histon H3. Isoliertes Enhancer of Zeste E(Z) zeigt jedoch keine HMTase Aktivität (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Ebert et al., 2004).

Während die Mitglieder von PRC2 in *Drosophila* Einzelkopie-Gene darstellen, so sind diese in *Arabidopsis* meist kleine Genfamilien. Zu dieser Pc-G Genfamilie gehören die *FERTILISATION INDEPEND SEED (FIS)* Gene, welche durch Mutantanalysen isoliert wurden. Diese Mutanten zeigen verschiedene Stadien der Samenentwicklung bei fehlender Fertilisation. (Chaudhury et al., 1997; Grossniklaus et al., 1998; Guitton et al., 2004; Ohad et al., 1996). Zu den bislang identifizierten *FIS*-Genen gehört *MEDEA (MEA)*, *FERTILISATION INDEPEND SEED 2 (FIS2)*, *FERTILISATION INDEPEND ENDOSPERM (FIE)* und *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1(MSII)*. Die von diesen Genen kodierten Proteine sind jeweils homolog zu den *Drosophila* PRC2-Proteinen 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). Eine zweite Klasse von Pc-G Proteinen wurde in *Arabidopsis* anhand von Mutanten identifiziert, welche durch frühzeitigen Blühbeginn und homeotische Transformationen gekennzeichnet sind. Dazu gehören *CURLEY LEAF (CLF)* und *EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2)* welche für Proteinen kodieren, die jeweils homolog zu den *Drosophila*-Proteinen E(Z) und Su(z)12 sind. (Goodrich et al., 1997; Yoshida et al., 2001). Eine dritte Klasse von Pc-G Proteinen wurde anhand ihrer Funktion bei der epigenetischen Reaktion auf die Vernalisation identifiziert. Dazu gehört *VERNALISATION2 (VRN2)* welches als Repressor für *FLOWERING LOCUS C (FLC)* fungiert. *VRN2* kodiert für ein Protein, welches homolog zu dem Su(z)12 aus *Drosophila* ist (Gendall et al., 2001). Auch gibt es Hinweise für die Interaktion der Mitglieder des PRC2-Komplexes in Pflanzen. So kann FIE mit den E(Z)-Homologen MEA, CLF und SWN, aber auch mit MSII interagieren (Katz et al., 2004; Kohler et al.,

2003; Luo et al., 2000; Spillane et al., 2000; Yadegari et al., 2000). Die Involvierung der E(Z) Proteine CLF und SWN von *Arabidopsis* in die Methylierung von Histon H3 Lysin27 ist anhand von *clf swn*-Doppelmutanten immunocytoologisch gezeigt worden (Lindroth et al., 2004).

Die Gruppe der TRITHORAX Proteine in *Arabidopsis* (ATX) umfasst die 5 Mitglieder ATX1-ATX5 (Alvarez-Venegas et al., 2001; Baumbusch et al., 2001), welche Homologie zum TRX Protein von *Drosophila* (Mazo et al., 1990; Stassen et al., 1995) und dessen Homologe aus *Homo sapiens* und *Mus musculus*, ALL-1 und HRX (Ma et al., 1993) sowie SET1 aus *Saccaromyces cerevisiae* (Nislow et al., 1997) aufweisen. Die Funktion von ATX1 ist bereits bekannt. ATX1 ist eine Histon-Methyltransferase, die spezifisch Histon H3 an der Position Lysin 4 methyliert. ATX1 ist ein Regulator für die Blütenentwicklung (Alvarez-Venegas et al., 2001). Die Familie der *ARABIDOPSIS* TRITHORAX-RELATED Proteine ATXR zählt mit zur Gruppe der TRITHORAX homologen Proteine, weist aber eine geringere Homologie zum tierischen TRX auf (Baumbusch et al., 2001). Die Funktionen dieser Proteine sind bislang nicht bekannt.

Die Gruppe der ASHH Proteine sind homolog zum *Drosophila* ASH1-Protein (*Absent, Small or Homeotic Discs1*, Tripoulas et al., 1996). ASH1 besitzt in *Drosophila* eine „Maintenance“- Funktion auf homeotische Gene während der Segmentbildung.

Die Gruppe der ASH1-related Proteine (ASHR) mit ihren 4 Mitgliedern wurde von ASHH aufgrund des Fehlens von Cystein-reichen Regionen im C-terminalen Bereich abgetrennt.

Die größte Gruppe der SET-Domänenproteine in *Arabidopsis* wird von den SU(VAR)3-9 Homologen (SUVH) und SU(VAR)3-9 related (SUVR) Proteine gebildet. SU(VAR)3-9 wurde zuerst bei *Drosophila* als dosisabhängiger Suppressor für PEV gefunden (Tschiersch et al., 1994). Das Gen kodiert für eine Histon-Methyltransferase, welche spezifisch Histon H3 an der Position Lysin 9 methyliert (Schotta et al., 2002). Aufgrund der Homologie von Aminosäuremotiven in der SET-Domäne, welche das katalytische Zentrum für eine Histon-Methyltransferase darstellen (Rea et al, 1999), wurde eine solche Funktion auch für die Proteine der SUVH- bzw. SUVV-Gruppe in *Arabidopsis* vermutet und konnte auch teilweise gezeigt werden.

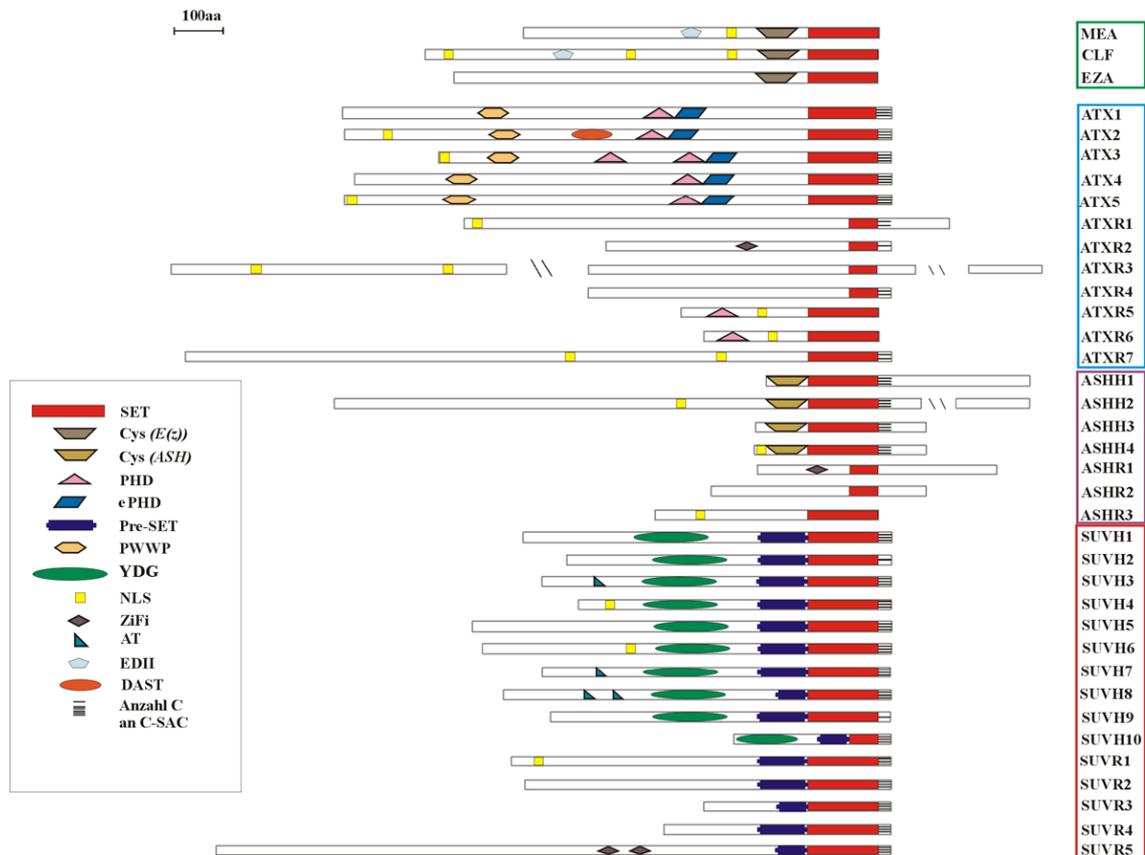


Abb. 1: Schematische Darstellung aller bisher in *Arabidopsis* identifizierten SET-Domänenproteine. Die SU(VAR)3-9 homologen und –*related* Proteine sind rot markiert (nach Baumbusch et al., 2001).

1.3 Zusammenspiel von DNA- und Histonmethylierung

Das Zusammenspiel von Histonmethylierung durch Methyltransferasen an H3 Lysin 9 und anderen Positionen sowie der DNA-Methylierung durch DNA-Methylasen und Nukleosomen-Remodeling Enzyme, wie CMT3, DRM1, DRM2, MET1 und DDM1, ist eine der Hauptvoraussetzungen für Gensilencing in Pflanzen (Jackson et al., 2002; Gendrel et al., 2002; Cao and Jacobson 2002 ; Tariq et al., 2003).

Dabei ist die Methylierung der DNA eine bei vielen Organismen beobachtete Modifizierung, welche eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin und bei Gen-Silencing im Zusammenwirken mit Histonmodifikationen spielt. Bei der DNA-Methylierung werden die Basen Adenin oder Cytosin durch spezifische Enzyme, den DNA-Methyltransferasen, enzymatisch durch Zufügen einer Methylgruppe modifiziert. Über die Modifizierung von Adenin ist bisher kaum etwas bekannt. Im Bezug auf das Silencing von Genen und die damit verbundenen Veränderungen der DNA-Methylierung wurden daher bislang vorrangig Cytosinmodifizierungen untersucht, wobei hier

gut etablierte Analysemethoden, wie Restriktionsbehandlung mit methylierungs-sensitiven Restriktionsendonukleasen, massenspektrometrische Messungen oder die Sequenzanalyse von Natriumbisulfid-behandelter DNA zur Anwendung kommen. Die Methylierung des Cytosins in Position 5 des Pyrimidinringes kann auch immunocytologisch durch spezifische Antikörper gegen diese Modifizierung beobachtet werden. Unter-(hypo) sowie über (hyper)-methylierte DNA-Sequenzen, insbesondere im Heterochromatin, werden durch Mutanten oder nach Überexpression von DNA-Methylasen nachgewiesen.

Die Cytosinbasen können sowohl spezifisch in den palindromen Sequenzmotiven CpG und CpNpG (N=A, C oder T), als auch in nicht-palindromen Motiven CpN (N=A, C oder T) methyliert werden. Diese werden dementsprechend als symmetrische bzw. asymmetrische DNA-Methylierung bezeichnet, wobei für beide Methylierungsarten unterschiedliche DNA-Methylasen verantwortlich sind. Während anfangs vor allem die symmetrische DNA-Methylierung im Zusammenhang mit Silencing gebracht wurde, ist die asymmetrische Methylierung in letzter Zeit immer mehr als gleichwertig für diesen Prozess betrachtet worden. Gerade in Pflanzen ist diese Form der DNA-Methylierung sehr häufig analysiert worden (Jacobsen und Meyerowitz, 1997), während sie in anderen Organismen seltener beobachtet wurde. Hier konnte die asymmetrische DNA-Methylierung vor allem in humanen Zellkulturen (Ramsahoye et al., 2000) sowie in *Neurospora crassa* und *Ascobolus immersus* (Selker et al., 1993; Goyon et al., 1994) beobachtet werden. Asymmetrische Methylierung wird vorrangig von einer *de novo* Methylase, DNMT, katalysiert. DNMT-Homologe wurden auch in anderen Organismen, wie z.B. in *Drosophila* (Lyco et al., 2000), gefunden. Während die DNA-Methylierung in *Drosophila* vor allem in den embryonalen Stadien beobachtet wird, ist sie in *Arabidopsis* in allen Entwicklungsstadien vorhanden. Schon im Wildtyp wurden DNA-Methylierungshöhen von 50%, an einigen Loci bis über 80% beobachtet (Malagnac et al., 2002). Dabei ist dementsprechend auch die Zahl der pflanzlichen DNA-Methylasen größer. Sie werden in *Arabidopsis* in drei Familien, MET1, CMT und DRM, unterteilt (Finnegan und Kovac, 2000). MET1 (METHYLTRANSFERASE1) ist eine Familie, welche funktionell homolog zu DNMT1 aus *Mus musculus* ist. Sie besitzt eine konservierte Methyltransferasedomäne im C-terminalen Bereich. Die Funktion von MET1 ist die Wiederherstellung des Methylierungsmusters des paternalen DNA-Stranges auf dem DNA-Tochterstrang, die „Maintenance“-Methylation. In MET1-Mutanten fehlt weitestgehend die symmetrische CpG-Methylierung. MET1 ist primär

für dieses Motiv aktiv, aber auch die anderen Sequenzmotive werden, wahrscheinlich indirekt, von MET1 beeinflusst.

CMT (CHROMOMETHYLASE) stellt die zweite Familie der pflanzlichen Methylasen mit dem wichtigsten Vertreter CMT3 dar. Diese Klasse besitzt eine Chromodomäne, welche zuerst in den *Drosophila* Proteinen Polycomb (Pc) und HP1 identifiziert wurde. Die Aufgabe dieser Domäne in *Drosophila* ist wahrscheinlich der Transport und die Bindung von Pc und HP1 an das Heterochromatin und andere Chromatinkomponenten. Dabei bindet die Chromodomäne von Pc an methyliertes H3K27, die HP1 Chromodomäne an di- und trimethyliertes H3K9 (Paro und Harte, 1996; Jackson et al., 2002). Es wird aber auch eine Funktion bei der Involvierung in RNA-Protein-Interaktionen diskutiert (Akhtar et al., 2000). CMT3 ist vor allem für die Methylierung des Motivs CpNpG spezifisch, es wurden jedoch auch Veränderungen in der asymmetrischen Methylierung in *CMT3*-Mutantenlinien beobachtet (Bartee et al., 2001). Die dritte Familie der Methylasen, DRM (*domains rearranged methylase*), ist homolog zu den menschlichen DNMT3-Enzymen, welche als *de novo* Methylasen fungieren (Okano et al., 1998). Die beiden untersuchten Vertreter dieser Familie in *Arabidopsis*, DRM1 und DRM2, sind für die Aufrechterhaltung der asymmetrischen DNA-Methylierung, aber auch für die Etablierung aller anderen Sequenzmotive verantwortlich (Cao und Jacobsen, 2002).

Ein mögliches Modell für das Zusammenspiel dieser DNA-Methylasen mit Histonmethyltransferasen ist bereits für CMT3 diskutiert worden (Lindroth et al., 2004). Hierbei bindet CMT3 an zuvor von SUVH4 und einer weiteren HMTase methyliertes Histon H3K9 und H3K27 und kann nachfolgend an den Targetsequenzen für die CpNpG-Methylierung enzymatisch aktiv werden.

Nachdem die Methylierung der DNA und der Histone als einer der wichtigsten Prozesse für die epigenetische Regulation der Genexpression erkannt wurde, stellte sich natürlich auch die Frage, ob dieser Mechanismus irreversibel oder umkehrbar, also eine Demethylierung bereits modifizierter DNA und Histone möglich ist.

Eine spezifische Demethylierung der DNA in Pflanzen wurde bereits analysiert. Dabei wurden bisher zwei DNA-Demethylasen, DEMETER und ROS1, charakterisiert, welche eine DNA-Glycosylasedomäne aufweisen. Mutanten dieser Gene zeigen eine erhöhte DNA-Methylierung (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002). Nachdem lange Zeit vermutet wurde, dass die Methylierung der Histone ein unumkehrbarer Prozess sei, ist seit neuem auch die Demethylierung von Histonen gezeigt worden. Der katalytische

Weg wurde zuerst für die humane Histondemethylase LSD1 beschrieben, welche spezifisch für die H3K4-Demethylierung wirkt (Shi et al., 2004). Dabei wird in einer oxydativen Reaktion unter Freisetzung von Formaldehyd die Methylgruppe entfernt. LSD1 homologe Proteine in *Arabidopsis* lassen auf einen evolutionär konservierten Mechanismus der Histondemethylierung durch diese Aminoxydasen schließen. Wahrscheinlich ist dabei auch die Demethylierung anderer Histonpositionen durch solche katalytischen Wege denkbar und erweitert so das Spektrum der posttranslationalen Modifizierung der Histone.

1.4 Gegenstand der Arbeit

Das Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestand in der molekularen und funktionellen Charakterisierung neuer SET-Domänenproteine aus *Arabidopsis thaliana*. Dabei sollte die Funktion dieser Proteine bei der Modifizierung von Histonen sowie die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die komplexen Regulationsmechanismen der Chromatinstruktur analysiert werden. Für die Charakterisierung der SET-Domänenproteine wurden transiente Assaysysteme in heterologen pflanzlichen Organismen etabliert, wodurch sowohl eine Lokalisierung der entsprechenden Fusionsproteine in den Zellorganellen, als auch eine cytologische Beobachtung der Chromatin-Assoziation dieser Proteine möglich war. Dies wurde, auch im Hinblick auf konservierte Funktionen, für die Heterochromatinproteine HP1 und SU(VAR)3-9 aus *Drosophila* durchgeführt. Zur Analyse von Proteinverteilungen, phänotypischen Effekten und Veränderung in der Histon- und DNA-Modifizierung wurden transgene *Arabidopsis*-Linien hergestellt. Dabei wurden myc- und GFP-fusionierte Proteine der SET-Domänengene *SUVH1* und *SUVH2* verwendet, welche eine cytologische Lokalisierung dieser Proteine im Zellkern von *Arabidopsis* erlaubten. Somit konnte erstmals eine Heterochromatin-Assoziation von SET-Domänenproteinen in *Arabidopsis* gezeigt werden. Durch weitere umfangreiche cytologische und molekularbiologische Analysen konnte ein Beitrag zur Aufklärung der Funktion der SET-Domänenproteine SUVH1 und SUVH2 bei der Modifizierung von Histonen und der Regulation der DNA-Methylierung im Zusammenspiel mit anderen Proteinen, wie DNA-Methylasen, geleistet werden. Gezeigt wurde auch die dosisabhängige Wirkung dieser Modifizierungen von der SUVH2 Proteinmenge. Für SUVH1 wurde eine spezifische Expression in der Wurzel gefunden, welche generell auf eine Spezifität in der Funktion der großen Anzahl von SET-Domänenproteine auf bestimmte Organe oder auch Entwicklungsabschnitten schließen lässt. Für die Chromatinproteine HP1 und SU(VAR)3-9 aus *Drosophila* konnte ebenfalls eine heterochromatische Assoziation gezeigt werden. Die Wirkung des *Drosophila* HP1 Proteins auf die Expression von Blütenentwicklungsgenen analog dem homologen TFL2 aus *Arabidopsis* lässt auf eine konservierte homologe Funktion von *DmHP1* in *Arabidopsis* schließen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Lösungsmittel und Oligonukleotide

Alle Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad sowie organische Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Diagonal (Münster), AppliChem (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) verwendet. Von Boehringer (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), GibcoBRL (Eggenstein), Roche Diagnostics (Mannheim) und Promega (Madison, USA) wurden Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, Ribonuklease A und DNA-Polymerasen benutzt. Mono- und polyklonale Antikörper wurden von MoBiTec (Göttingen), Eurogentec (Seraing, Belgien), Dunn Labortechnik (Asbach) sowie von Biomol (Hamburg) bezogen. Radioaktiv markiertes S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] Methionin wurde von Amersham LIFESCIENCE (Freiburg), synthetisierte Oligonukleotide von MWG-Biotech (Ebersberg) erworben. Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide befindet sich als Liste im Anhang

2.1.2 Mikroorganismen

Als Wirt für die zu transformierenden Plasmide wurde der Stamm von *Escherichia coli* DH5 α (INVITROGEN, Karlsruhe) mit dem Genotyp: *F*, $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, *U169*, *deo R*, *recA1*, *end A1*, *hsdR17*, (*rK*⁻,*rK*⁺), *phoA*, *supE44*, λ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1* verwendet. Für die Expression der rekombinanten Proteine wurde der Stamm BL21 (Promega, Mannheim) mit dem Genotyp: *F*⁻, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B*-*m_B*⁻), *dcm*, *gal*, (*DE3*), *pLysS*, *Cm^r* benutzt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 0,1mM IPTG für 1,5 h bei 30°C. Zur Erzeugung transgener Pflanzen mittels T-DNA Transformation wurde *Agrobacterium tumefaciens* *GV3101 pMP90* verwendet (Koncz und Schell, 1986).

2.1.3 Nährmedien für *Escherichia coli*

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Broth Flüssigmedium (DUCHFA, Harleem/Niederlande, 20g/l) oder auf LB-Agar (DUCHEFA, Harleem/Niederlande). Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden den Medien die den Selektionsmarkern entsprechenden Antibiotika zugegeben: Ampicillin (100mg/l) bzw. Kanamycin (50mg/l) sowie Chloramphenicol (300mg/l). Eine Selektion auf β -Galactosidase erfolgte mit Xgal (20mg/l in Dimethylformamid).

2.1.4 Vektoren

Die für diese Arbeit verwendeten Vektoren sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tab.1: Verwendete Vektoren

Vektor	Merkmale	Verwendung / Referenz
pBluescript [®] II KS (+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor/ Stratagene (Heidelberg)
pGEM [®] -3Zf(+)	Amp ^r , MCS, LacZ α , M13-Primerbindungsstellen	Klonierungsvektor/ Promega (Madison, USA)
pKEx4tr-GFP	Amp ^r , MCS, EGFP 327	Vektor für transiente Expression eines EGFP327-Fusionsproteins (ABRC STOCK CENTRE) unter Kontrolle des <i>CaMV</i> -35S Promoters
pBI121	Kan ^r , T-DNA-borders, MCS	Ausgangsvektor zur Konstruktion des binären pBI1,4t Vektors (Clontech)
pBI 1,4t-myc	Kan ^r , MCS, myc-tag, T-DNA-borders	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Expression eines myc-Fusionsproteins unter Kontrolle des <i>CaMV</i> 35S* -Promoters

pTA7002-EGFP	Hyg ^r , MCS, EGFP, induzierbarer Promoter, T-DNA-borders	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Expression eines EGFP-Fusionsproteins in Pflanzenzellen unter Kontrolle des Dexamethason induzierbaren Gluco-corticoid <i>GVG</i> -Promoters (Aoyama et al., 1997)
pGPTV-LUC	Kan ^r , T-DNA-borders, <i>LUC</i>	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , enthält das <i>Luciferase</i> -Reportergen (Becker et al., 1992; Hofmann, 2004)
pKEX4tr-GUS	Amp ^r , MCS, <i>GUS</i>	Vektor für transiente Expression eines <i>GUS</i> -Fusionsproteins unter Kontrolle des <i>CaMV-35S</i> Promoters
pGEX2T	Amp ^r , MCS, GST	Vektor zur Expression von GST-Fusionsproteinen unter <i>tac</i> -Promoterkontrolle (Amersham Biosciences)
pBI Δ 35S* <i>GUS</i>	Kan ^r , MCS, T-DNA-borders, <i>GUS</i>	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , für 35S* können endogene Promotoren verwendet werden

2.1.5 Pflanzenmaterial

Für diese Arbeit wurden verschiedene Pflanzenarten als Modellorganismus genutzt.

Zur Untersuchung der Kernlokalisierung von Fusionsproteinen in den transienten Assays wurden Epidermiszellen der Zwiebeln von *Allium cepa* sowie *Scilla mischtschenkoana* genutzt.

Für die anderen Arbeiten an Pflanzen wurde *Arabidopsis thaliana* genutzt und dabei der bereits gut charakterisierte Ökotyp Columbia verwendet, dessen Genom nahezu vollständig, unter anderem durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt, sequenziert ist (*Arabidopsis Genom Initiative* 2000). T-DNA Insertionsmutanten (SALK-Linien) wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre bezogen.

2.1.6 Kulturmedien für die Anzucht und Haltung der Pflanzen

Arabidopsis-Samen wurden auf einem Medium nach Murashige und Skoog (1962) ausgebracht, welches 4,4g/l M&S Salz, 10g/l Select Agar sowie 20g/l Saccharose enthält. Zur Selektion auf T-DNA Marker wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika, Kanamycin (50mg/l) bzw. Hygromycin (50mg/l) zugesetzt, bei Medium für induzierbare Promoterkonstrukte 0,01mM Dexamethason. Als Auflage für die Epidermiszellen in den transienten Assays wurden M&S-Platten, bestehend aus 30g/l Saccharose, 20g/l Select Agar und 4,4g/l M&S Salz, verwendet. Zur Kultivierung der beschossenen Epidermiszellen wurde flüssiges M&S-Nährmedium verwendet. Die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* sowie von *Scilla mischtschenkoana* erfolgte vorwiegend auf einem Gemisch aus 3 Teilen Einheitserde ED 73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) und 1 Teil Vermiculite[®] (Gärtnereibedarf Kammlott, Erfurt).

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Klonierung von Fusionskonstrukten

Für die verschiedenen Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von *GUS*-, EGFP-, myc- und GST-Fusionskonstrukten hergestellt und in die entsprechenden Vektoren kloniert. In der Regel erfolgte nach der PCR-Amplifikation des Konstruktes eine Zwischenklonierung in den pGEM[®]-3Zf(+)-Vektor mit anschließender Restriktion und Ligation des Fragmentes in den Zielvektor. Die klonierten Gene, verwendeten Primer und Vektoren sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tab.2: Für diese Arbeit klonierte Gene und ihre Verwendung.

Kloniertes Gen (Länge in bp)	verwendeter Vektor	verwendete Primer, Restriktionsenzyme	Bemerkung, Verwendung
<i>SUVH1</i> (1-2010)	pKEX4tr-GUS	SUVH1-start, <i>Sall</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	gesamtes Gen (ORF) als <i>GUS</i> -Fusion für transienten Assay
<i>SUVH1</i> (1-2010)	pKEX4tr-GFP	SUVH1-start, <i>Sall</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	gesamtes Gen (ORF) als GFP-Fusion für transienten Assay
<i>SUVH1</i> (1-2010)	pBI 1,4t-myc	SUVH1-start, <i>Sall</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	gesamtes Gen (ORF) als myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis</i>
<i>SUVH1</i> (1-2010)	pTA7002-EGFP	SUVH1-start, <i>Sall</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	gesamtes Gen (ORF) als EGFP-Fusion zur Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis</i> mit induzierbarer Expression des Transgens
<i>SUVH1</i> (1-2010)	pGEX2T	SUVH1-start, <i>Sall</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	gesamtes Gen (ORF) als GST-Fusion zur Proteinexpression /-aufreinigung
<i>SUVH1</i> (873-2010)	pGEX2T	SUVH1-291, <i>EcoRI</i> SUVH1-stop, <i>Sall</i>	verkürztes Konstrukt als GST-Fusion zur Proteinexpression /-aufreinigung
Promoter- <i>SUVH1</i> (-1173-1)	pBIΔ 35S*- <i>GUS</i>	SUVH1gen.Start, <i>EcoRI</i> , SUVH1 gen.Ende, <i>BamHI</i>	5' genomischer Promoterbereich von <i>SUVH1</i> als <i>GUS</i> -Fusion für Promoteranalysen
<i>SUVH2</i> (1-1953)	pKEX4tr-GFP	SUVH2-start, <i>BamHI</i> SUVH2-stop, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als GFP-Fusion für transienten Assay
<i>SUVH2</i> (1-1953)	pBI 1,4t-myc	SUVH2-start, <i>BamHI</i> SUVH2-stop, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis</i>
<i>SUVH2</i> (873-1953)	pGEX2T	SUVH2YDG, <i>BamHI</i> SUVH2-stop <i>Xho</i> , <i>XhoI</i>	verkürztes Konstrukt als GST-Fusion zur Proteinexpression /-aufreinigung

<i>SUVH2</i> (1-1953)	pTA7002-EGFP	SUVH2-start <i>Xho</i> , <i>XhoI</i> SUVH2-stop <i>Xho</i> , <i>XhoI</i>	gesamtes Gen (ORF) als EGFP-Fusion zur Herstellung von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> mit induzierbarer Expression des Transgens
<i>HP-1 Dm</i> (1-621)	pKEX4tr-GFP	HP1Eco, <i>EcoRI</i> HP1Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als GFP-Fusion für transienten Assay
<i>HP-1 Dm</i> (1-621)	pBI 1,4t-myc	HP1Eco, <i>EcoRI</i> HP1Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Su(var)3-9 Dm</i> (1-1905)	pKEX4tr-GUS	3-9 Eco, <i>EcoRI</i> 3-9 Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als <i>GUS</i> -Fusion für transienten Assay
<i>Su(var)3-9 Dm</i> (1-1905)	pKEX4tr-GFP	3-9 Eco, <i>EcoRI</i> 3-9 Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als GFP-Fusion für transienten Assay
<i>Su(var)3-9 Dm</i> (915-1905)	pGEX2T	3-9 Eco, <i>EcoRI</i> 3-9 Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als GST-Fusion zur Proteinexpression und Proteinaufreinigung
<i>Su(var)3-9 Dm</i> (1-1905)	pBI 1,4t-myc	3-9 Eco, <i>EcoRI</i> 3-9 Bam, <i>BamHI</i>	gesamtes Gen (ORF) als myc-Fusion zur Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Clf</i> (1-2709)	pKEX4tr-GUS	clf-A-Not, <i>NotI</i> clf-B-Not, <i>NotI</i>	gesamtes Gen (ORF) als <i>GUS</i> -Fusion für transienten Assay
<i>SUVH3</i> (1-2010)	pKEX4tr-GUS	SUVH3-Start, <i>XhoI</i> SUVH3-Stop, <i>XhoI</i>	gesamtes Gen (ORF) als <i>GUS</i> -Fusion für transienten Assay
<i>SUVH3</i> (1-2010)	pKEX4tr-GFP	SUVH3-Start, <i>XhoI</i> SUVH3-Stop, <i>XhoI</i>	gesamtes Gen (ORF) als GFP-Fusion für transienten Assay

Die Sequenzen der dabei verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt.

2.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die zu klonierenden DNA-Fragmente der entsprechenden Gene wurden entweder neu durch PCR oder über Restriktion bestehender Fragmente aus anderen Plasmiden gewonnen. Die zu klonierende PCR-Produkte wurden zur Verringerung von PCR-Fehlern mit *Pfu*-Polymerase (Promega, Mannheim) unter Verwendung von spezifischen Primern amplifiziert. Die Amplifikation der meisten in dieser Arbeit verwendeten Gene erfolgte aus einer *Arabidopsis* UNI-ZAP cDNA-Bibliothek (STRATAGENE, Amsterdam /Niederlande). Für die Restriktion von Fragmenten aus Plasmiden wurden die jeweiligen sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen, 1 bis 5 U Enzym je μg DNA, unter Zugabe der zugehörigen Puffer verwendet, und der Ansatz bei der entsprechenden Inkubationstemperatur inkubiert.

2.2.3 Klonierung von Fragmenten und Transformation von *Escherichia coli*

Die mittels PCR amplifizierten oder aus anderen Vektoren erhaltenen Fragmente wurden nach dem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den jeweiligen Vektor ligiert, welcher vorher ebenfalls mit den geeigneten Restriktionsenzymen vorbereitet wurde. Bei ungerichteten Ligationen wurde der Vektor vorher mit CiAP (Calf intestine alkaline phosphatase, MBI Fermentas, St-Leon Rot) nach den Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Die amplifizierten DNA Fragmente wurden nach der PCR in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels einem DNA-Extraktionskit (QUIAGEN, Hilden) aus dem Gel eluiert. Zur Ligation der DNA-Fragmente in die entsprechend vorbereiteten Vektoren wurde die DNA-Fragmente mit der Vektor-DNA in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1 verdünnt und der Ligationsansatz mit 1 U T4-DNA-Ligase und zugehörigen Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 20 μl 3 h bei 16°C oder über Nacht bei 14°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 5 μl zur Transformation in kompetente *E. coli* Zellen verwendet. Dazu wurden die kompetenten Zellen des *E. coli* Stammes DH5 α (INVITROGEN, Karlsruhe) im Eisbad aufgetaut und zu 50 μl aliquotiert. Zu einem Aliquot wurden 5 μl

des Ligationsansatzes pipettiert und die Zellen 20 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 30 sec. Nach 2 min auf Eis wurden 250 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 1h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolation der Plasmide aus *E.coli* wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) vorgegangen. 2 ml LB-Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37° auf dem Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde bei 4500 U für 10 min pelletiert und in 200 µl P1 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RnaseA) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer (200 mM NaOH; 1% SDS) 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 200 µl P3-Puffer (2,8 M Na-Acetat; pH 5) zugegeben, gut gemischt und die Probe 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und bei 13000 Upm 30 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl TE-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Für die Isolation von Plasmid-DNA für die Sequenzanalyse wurden 2 ml Kultur mit einem Plasmid-Aufreinigungskit der Firma Marligen (BioCat, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers behandelt.

2.2.5 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Zur Isolation pflanzlicher DNA wurde nach der Methode nach Brandstädter (1994) vorgegangen. Dazu wurden 3-5 Blätter von *Arabidopsis thaliana* (ca. 1 g) in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit flüssigen Stickstoff eingefroren, mit einem vorgekühlten Glasstab fein zermörsert und anschließend in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1,5 % SDS) resuspendiert.

Anschließend wurden 300 µl essigsaure Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure) zugegeben und der Ansatz für mindestens 10 min im Eisbad inkubiert, die Probe dann 15 min bei 20000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) extrahiert. Nach Zentrifugation bei 6000 Upm für 6 min wurde die wässrige Oberphase abgetrennt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die DNA anschließend mit 500 µl Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 15000 Upm sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Zur Kontrolle wurden 5 µl der isolierten DNA anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.6 Isolation von pflanzlicher RNA

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde die Trizol[®]-Methode entsprechend den Angaben des Herstellers (GibcoBRL) angewandt. Dazu wurden insgesamt 3-5 Blätter (1 g) in einem 2 ml Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem kleinen Mörser pulverisiert und in 1 ml Trizol[®] resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 240 µl Chloroform zugegeben, erneut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation von 10 min bei 6000 Upm wurde die Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die RNA mit 1 Volumen Isopropanol ausgefällt und bei 15000 Upm 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl sterilen Wasser aufgenommen.

2.2.7 RT-PCR-Analysen

Für die semiquantitativen RT-PCR-Experimente wurden jeweils 1 µg isolierte RNA eingesetzt. Zu dieser RNA wurden 5 x M-MLV Reaktionspuffer und M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim), dNTP's sowie RNase-Inhibitor in den entspre-

chenden Volumenverhältnissen zugegeben, mit RNase-freien Wasser aufgefüllt und nach Angaben des Herstellers inkubiert. Für die RT-PCR Expressionsanalysen wurden die in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführten Primer verwendet.

Tab. 3: Genspezifische Primer für die RT-PCR Analysen.

Gen	verwendete Primerpaare
<i>SUVH1</i>	AtSUVH1-3, AtSUVH1-7
<i>SUVH2</i>	AtSUVH2-6, AtSUVH2-8
<i>SUVH3</i>	AtSUVH3 forw, AtSUVH3 back
<i>SUVH4</i>	MAC12-5, MAC12-8
<i>SUVH5</i>	AtSUVH5-1, AtSUVH5-2
<i>AtCyclophilin</i>	Cyclophilin, Cyclophilin stop
<i>AP3</i>	AP3F258, AP3R460
<i>PI</i>	Pistillata F327, Pistillata R55
<i>18SrDNA</i>	18SrDNAF214, 18SrDNA R478

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt.

2.2.8 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Für die FISH Analyse wurde eine Digoxigenin markierte 180 bp-Sonde hergestellt. Dazu wurde das 180 bp-Fragment aus genomischer DNA unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert und in den Vektor pGEM[®]-3Zf(+) kloniert. Die Markierung der 180 bp-DNA erfolgte in einer nachfolgenden PCR mit spezifischen Primern für das 180 bp-Repeat unter Verwendung des DIG DNA Labeling Mixes (Roche, Mannheim).

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA in horizontalen Agarosegelen wurde Agarose (INVITROGEN, Karlsruhe) in Konzentrationen von 0,8% - 1% genutzt. Diese wurde in TBE-Puffer (100 mM Tris-Borat, pH 8,3; 1 mM EDTA) durch Erhitzen

gelöst, zum Anfärben der DNA wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde den DNA-Proben 0,2 Volumen Stoppuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 120 mM EDTA; 50 % Glycerin; 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) zugegeben. Als Größenmarker wurde eine 1 kb DNA-Leiter (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Zur Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde ein Transilluminator sowie ein Digitaldrucker (Mitsubishi, Ratingen) verwendet.

2.2.10 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Übertragung von DNA in *Agrobacterium* wurde die Methode nach Höfgen und Willmitzer (1988) genutzt. Dazu wurden zuerst kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 hergestellt. 2-4 ml einer Übernachtskultur dieses Stammes wurden in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 10 mg/l Gentamycin und 100 mg/l Rifampicin gegeben und für 6-10 h im Schüttelinkubator bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Nachdem die Kultur im Eisbad abgekühlt wurde, erfolgte die Sedimentation der Zellen für 10 min bei 3000 x g. Das Pellet wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert, zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für die Plasmidtransformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, 1-5 µg Plasmid-DNA zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff für 5 min eingefroren und dann ein Hitzeschock der Zellen für 5 min in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 2-4 h bei 28°C und 160 Upm im Schüttelinkubator kultiviert, 100 µl des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und ca. 48 h bei 28°C inkubiert.

2.2.11 Plasmidtransformation in *Arabidopsis thaliana*

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der Vacuuminfiltrationsmethode (Bechtold et al. 1993). Eine 50 ml *Agrobacterium*-

Übernachtskultur (GV3101) in LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Rifampicin und 10 mg/l Gentamycin wurde in 500 ml LB-Medium mit den gleichen Antibiotika verdünnt und erneut über Nacht bei 28°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wurde anschließend bei 4000 Upm 20 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 ml Infiltrationsmedium (0,5 x M&S-Medium, 3 % Saccharose, 0,044 µM Benzylaminopurin) aufgenommen. In diese Suspension wurden die Blütenstände frischblühender *Arabidopsis*-Pflanzen getaucht und dann einem Vakuum in einem Exikator mit Vakkumpumpe ausgesetzt, bis an den Pflanzen starke Bläschenbildung zu beobachten war. Anschließend wurden die Blütenstände mit Wasser gewaschen, vorsichtig abgetupft und die Pflanzen für 24 Stunden dunkel gestellt. Bis zur Reifung der Samen wurden diese Pflanzen unter Langtagbedingungen gehalten. Die Selektion der erhaltenen transgenen Pflanzen erfolgte durch Ausplattieren der Samen auf Selektionsmedium mit der entsprechenden Konzentration von Kanamycin bzw. Hygromycin.

2.2.12 Anzucht des Pflanzenmaterials

Nach der Entfernung der Testa durch Inkubation (10 min) in 12%iger Natriumhypochlorid-Lösung und anschließenden dreimaligen Waschen in sterilen Wasser wurden die so oberflächensterilisierten Samen von *Arabidopsis thaliana* auf M&S-Agarplatten ausgebracht, über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend bis zum Pikieren unter Langtagbedingungen gehalten. *Arabidopsis thaliana* wurde in einer Phytokammer der Firma Vötsch Industrietechnik (Balingen-Frommern) bzw. in Klimaschränken von Percival Scientific Inc. (Perry, USA) unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht und 23°C sowie 16 Stunden Dunkelheit und 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %) angezogen. Zur Induktion der Blütenbildung wurde *Arabidopsis* unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) gehalten.

2.2.13 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Für die Kreuzungsexperimente wurden von den als weibliche Kreuzungspartner vorgesehenen Blüten die Antheren entfernt. Von der als männlicher Kreuzungspartner verwendeten Blüte wurden die Antheren mit Hilfe einer Pinzette abgetrennt und die darin befindlichen Pollen für die Befruchtung auf das Gynözeum des vorbereiteten weiblichen Kreuzungspartners übertragen.

2.2.14 Proteinextraktionen

Zur Isolation des myc-Fusionsproteins aus *Arabidopsis* wurde die Phenol-Extraktionsmethode (Hurkman und Tanaka, 1986) mit einigen Modifizierungen verwendet. Dazu wurden 1g Blätter in einem Mörser mit flüssigen Stickstoff zu einem feinem Pulver zerkleinert und in 2 ml kalten Extraktionspuffer (0,7 M Saccharose; 0,5 M Tris; 30 mM HCl; 0,1 M KCl; 2% β -Mercaptoethanol) unter kontinuierlichem Mörsern resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 50 ml GREINER-Röhrchen überführt und auf 6 ml mit Extraktionspuffer aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurde die Suspension bei 5000 Upm 5 min pelletiert, und der Überstand in ein neues 50 ml GREINER-Röhrchen überführt. Zu diesem Überstand wurde 1 Volumen eiskaltes Phenol zugegeben, gemischt und 45 min bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 6000 Upm für 10 min erfolgte die Trennung der Phasen. Die phenolische Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, 5 Volumen Präzipitationspuffer (0,1 M Ammoniumacetat in eiskaltem Methanol) zugegeben und die Proteine bei -20°C ausgefällt. Die Probe wurde anschließend 10 min bei 5000 Upm abzentrifugiert, das Pellet luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Für die Extraktion der Histone aus *Arabidopsis* wurde die Methode nach Houben (Houben et al., 2003) in leicht modifizierter Form angewendet. Hierfür wurden 1g Blattmaterial von *Arabidopsis* in einem Mörser unter Verwendung von flüssigen Stickstoff fein zerkleinert und in 800 μ l Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,9; 400 mM Saccharose; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 0,025% NaN₃;

1,5 mM PMSF; 1 mM DTT) resuspendiert. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung (Sonoplus, BANDELIN, Berlin) wurden 800 µl 0,4 M H₂SO₄ zur Probe gegeben und der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Abzentrifugation der Zelltrümmer bei 1400 g für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Methanol/Chloroform (1:1) versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Phasen durch Zentrifugation für 10 min bei 1400 g separiert, die Interphase abgetrennt und mit 1 ml eiskalter 80%igen Acetonlösung gewaschen, luftgetrocknet, in 250 µl Ladepuffer (ROTH, Karlsruhe) resuspendiert und bis zur Verwendung eingefroren. Zur Kontrolle wurden die myc-Proteinextraktionen auf ein 12%iges, die Histonextraktionen auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Coomassielösung (50% Methanol; 40% H₂O; 10% Essigsäure; 0,25% Brilliant Blue R 250, SIGMA) eingefärbt, anschließend mit Entfärbelösung (40% Methanol; 7 % Essigsäure) entfärbt.

2.2.15 Nachweis der Proteine im Westernblot

Zum Nachweis von Fusionsproteinen im Westernblot wurden für die myc-Fusionen 10%ige, für die Auftrennung der Histone 15%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Tab. 4: Verwendete Polyacrylamidgele. Mengen in ml.

Konzentration	Trenngel						Sammelgel
	8%		10%		15%		5%
Menge	10 ml	15 ml	10 ml	15 ml	10 ml	15 ml	4 ml
dest.Wasser	4,6	7	4	5,9	2,3	3,5	2,7
30% AA-mix	2,7	4	3,3	5	5	7,5	0,67
1,5M Tris-Cl,pH8,8	2,5	3,8	2,5	3,8	2,5	3,8	-
1,5M Tris-Cl,pH6,8	-	-	-	-	-	-	0,5
10% SDS	0,1	0,15	0,1	0,15	0,1	0,15	0,04
10%APS	0,1	0,15	0,1	0,15	0,1	0,15	0,04
TEMED (ml)	0,006	0,009	0,004	0,006	0,004	0,006	0,004

Nach Aufnahme der Proben im Ladepuffer wurden diese bei 95°C aufgeköcht, 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, der Überstand auf ein Polyacrylamidgel mit der entsprechenden Konzentration aufgetragen und die Proteine bei 25 mA/Gel in Laufpuffer (0,025 M Tris; 0,1% SDS; 0,192 M Glycin) aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porenweite, SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel) mittels eines Semidry-Blotters bei 150 mA für 1,5 h transferiert. Anschließend wurde die Antikörperfärbung durchgeführt. Für den Nachweis des myc-Antigens wurde die Membran in 5% Milchpulverlösung (5% Milchpulver in PBST, 1xPBS [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,6]; 0,1% Tween 20) für 1 h präinkubiert und dann mit c-myc-Antikörper (anti-Maus, 1:1000 in 5% Milchpulverlösung, DUNN, Asbach) für 1h bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde 3 mal für 15 min in PBST gewaschen und nachfolgend mit dem sekundären Antikörper (1:1000, Ziege-anti-Maus, Peroxydase konjugiert, MOBITEC, Göttingen) inkubiert. Nach dem Waschen der Membran 2 mal 20 min in 1xPBST, dann 1x in PBS, erfolgte der Nachweis des Antikörpers mittels ECL-Kit (AMERSHAM LIFESCIENCE, Freiburg) nach Angaben des Herstellers.

Für den Nachweis von Histonmodifikationen im Westernblot wurden polyklonale Antikörper gegen mono-, di- und trimethyl H3K9, monomethyl H3K27 sowie monomethyl H4K20 (AG T.Jenuwein, Wien sowie BIOMOL, Hamburg) genutzt. Dazu wurde die Membran nach der Präinkubation in BSA (3% BSA in 1xPBST) für 1 h mit dem primären Antikörper für die entsprechenden Histonmodifizierung (1:1000 in 3% BSA) bei 37°C inkubiert. Nach 3 maligen Waschen in PBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:1000, Ziege-anti-Kaninchen, Peroxydase konjugiert, MOBITEC, Göttingen). Nach dem Waschen der Membran (2 mal 20 min in 1xPBST, dann 1x in PBS) erfolgte wiederum der Nachweis des Antikörpers mittels ECL-Kit (AMERSHAM LIFESCIENCE, Freiburg) nach Herstellerangaben.

2.2.16 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die in den Vektor pGEX2T klonierten Gene (s. Tab. 1) in den Bakterienstamm BL21 transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in 50 ml LB-Ampicillin Flüssigmedium über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert und am nächsten Tag in 200 ml LB-Ampicillin Flüssigmedium überführt und bis zu einer $OD_{600}=0,5-0,6$ inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression für 1,5 h mit 150 μ M IPTG induziert. Nach Pelletierung der Kultur für 20 min bei 4500 Upm wurde das Pellet mit 50 mM Tris gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in 20 mM RIPA-Puffer (500 mM NaCl; 20 mM TrisCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 1% NP40; 0,5% Na-desoxycholat; Proteinaseinhibitor-Mix, ROCHE, Mannheim) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von Lysozym (5 mg/ml) und einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Zum weiteren Aufschluß wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff schockgefroren, aufgetaut und einer Ultraschallbehandlung von 3 mal 10 sec unterzogen. Die Zelltrümmer wurden bei 15000 Upm 15 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Dazu wurden 250 μ l GST-Bead Suspension (AMERSHAM LIFESCIENCE, Freiburg), welche nach Angaben des Herstellers vorbereitet wurden, pipettiert. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Beads erfolgte über Nacht auf einem Drehinkubator bei 4°C. Anschließend wurden die GST-Beads 5 min bei 500g abzentrifugiert, 2 x mit RIPA-Puffer gewaschen und in 250 μ l RIPA-Puffer resuspendiert.

2.2.17 Histon-Methyltransferase Assay

Für den Transfer von C_{14} -markierten Methylgruppen auf ein Substrat wurden 15-25 μ g rekombinantes GST-Fusionsprotein genutzt. Nach zweimaligen Waschen in MAB-Puffer (0,25 M Saccharose; 0,05 M TrisCl pH 8,5; 0,02 M KCl; 0,01 mM β -Mercaptoethanol) wurden zu 90 μ l GST-Beads 25 μ l MAB-Puffer, 6 μ l SAM sowie das zu methylierende Substrat (10 μ g Kalbshistone, 5 μ g rekombinante rekonstituierte Nukleosomen oder 5 μ g Peptide) zugegeben und 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit ROTILOAD-Puffer (ROTH, Karlsruhe) bei 95°C inkubiert, ab-

zentrifugiert und der Überstand auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, entfärbt, getrocknet und auf eine Imaging-Platte (FUJIFILM, Japan) aufgelegt. Die Analyse der Autoradiographie erfolgte mit einem Phosphoimager (FUJIFILM, Japan).

2.2.18 DNA-Sequenzanalyse

Zur DNA-Sequenzanalyse wurde die Methode nach Sanger (1977) angewandt. Zur Probenvorbereitung wurden 5 µl aufgereinigte Plasmid-DNA (1-1,5 µg) für die PCR eingesetzt. Dazu wurden 0,1 µl (10 pmol) des entsprechenden Primers, 2 µl Big-Dye-Mix (APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt) und 1 µl des zugehörigen Puffers gegeben, auf 10 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt und die PCR Reaktion in einem Biometra-Cycler (BIOMETRA, Göttingen) mit dem entsprechenden Programm durchgeführt. Nach der Reaktion wurde die DNA mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 3 Vol 96%igem Ethanol präzipitiert, bei 13000 Upm für 20 min pelletiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit einem ABI377 (APPLIED BIOSYSTEMS, Darmstadt).

2.2.19 Transiente Expression in Epidermiszellen von *Scilla* und *Allium*

Für die Expression wurden die Vektoren pKEx4tr-GUS sowie pKEx4tr-GFP verwendet, in welche die entsprechenden Gene „*in frame*“ inkloniert wurden (s. Tab. 2). Für das Bombardement wurden 1 mg Goldpartikel (1,6 Mikron, BIO-RAD, München) und 50 µl 50%ige sterile Glycerollösung in einem Eppendorfgesäß bis zum Erreichen einer homogenen Suspension gemischt und 10 µl 100 mM Spermidin, 25 µl CaCl₂ sowie 1 µg Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 3 min vorsichtig gemischt (Vortexer), 1 min zum Absetzen der Goldpartikel stehen gelassen, dann kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Goldpellet mit 70%igen, anschließend mit 96%igen Ethanol gewaschen, in 30 µl 96%igen Ethanol resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Epidermiszellen wurden direkt von frischen Zwiebeln abgezogen und

auf M&S-Agarplatten aufgelegt. Diese wurden in die Vakuumkammer der Partikelkanone (BIO-RAD PDS 1000 Helium-Partikel Delivery System, BIORAD, München) mit einem Abstand von 5 cm von der Beschussdüse eingesetzt. Die vorbereiteten Goldpartikel wurden auf passende Aluminiumfoliescheibchen aufgetragen, diese in die Düse eingesetzt und mit einem Druck von 5,5 bar bei 130 mbar Kammerdruck auf die Epidermiszellen beschossen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml M&S Nährlösung überschichtet und bei 28°C über Nacht inkubiert. Die *GUS*-Fusionsproteine wurden nach Anfärbung mit Färbelösung, die GFP-Fusionsprotein unter UV-Licht ausgewertet.

2.2.20 Nachweis von β -Glucuronidase

Das Enzym β -Glucuronidase (*GUS*) wurde nach transienter bzw. stabiler Expression von *GUS*-Fusionsproteinen in den Epidermiszellen von *Allium cepa* sowie in *Arabidopsis thaliana* anhand einer Farbreaktion unter Verwendung von X-Gluc nachgewiesen. Dazu wurden die Epidermiszellen nach dem Bombardement bzw. Keimlinge oder Organe von *Arabidopsis* für 24 h in 2 ml *GUS*-Färbelösung (50 mM Natriumphosphat pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,1 % Triton; 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin; 0,7 μ g/ml β -Mercaptoethanol; 1 mg/ml X-Gluc) gelegt und bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen des Chlorophylls wurde das Material nachfolgend 3 mal mit 70%igen Ethanol bei 4°C gewaschen.

2.2.21 Immunozytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern

Für die immunocytologischen Analysen wurden verschiedene Antikörper verwendet. Für die verschiedenen Epitope war auch eine unterschiedliche Fixierung des verwendeten Gewebes notwendig:

Nachweis von methylierter DNA

Junge Rosettenblätter von *Arabidopsis* wurden in eiskalter Fixierungslösung (Methanol/Essigsäure, 3:1) für 1 h fixiert und anschließend 2 mal für 10 min in

Citronensäure-Natriumcitratpuffer (0,01 M Citronensäure-monohydrat; 0,01 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat, pH 4,8) gewaschen. Die Proben wurden in Cellulasepuffer (20% Cellulase Onozuka R-10 in Citronensäure-Natriumcitratpuffer, MERCK, Darmstadt) 45 min bei 37°C verdaut, 2 mal für 10 min in Citronensäure-Natriumcitratpuffer gewaschen und anschließend mit einer Pipette in 50 µl 1xPBS suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Objektträger übertragen, verteilt und mit 3 Tropfen 45% iger Essigsäure versetzt. Nach dem Abdecken mit einem Deckglas wurde die Probe gequetscht und in Trockeneis eingefroren. Nach dem Absprennen des Deckglases wurde das Präparat bei 60°C für 30 min gebacken und anschließend für 5 min in Denaturierungspuffer (70% Formamid; 2xSSC; 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0) inkubiert. Die Präparate wurden dreimal für 5 min in eiskalter 1xPBS-Lösung gewaschen und in BSA-Lösung (1% BSA in 1xPBS) für 30 min bei 37°C präinkubiert. Dann wurde mit dem primären Antikörper gegen 5-Methylcytosin (1:400 in 1%BSA, monoklonal, anti-Maus, EUROGENTECH, Belgien) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen in 1xPBS für 5 min erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in 1xPBS, Ziege-anti-Maus, Alexa 488 konjugiert, MOBITEC, Göttingen) für 1 h bei 37°C. Nach dem 3maligen Waschen mit 1xPBS zu je 5 min erfolgte die Gegenfärbung der DNA mit DAPI (0,2 µg/ml in McIlvaine Puffer [0,01 M Citronensäure; 0,02 M Na₂HPO₄, pH7; 25% Glycerol]).

FISH-Analysen

Die Präparate wurden bis zur Inkubation bei 60°C analog zum Nachweis methylierter DNA behandelt, nachfolgend 2x5 min mit 2xSSC (0,3 M Natriumcitrat-Puffer pH 7,4; 0,3 M NaCl) gewaschen. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung (10 µg/ml RNaseA in 2xSSC) für 1 h bei 37°C, die Präparate wurden dann zweimal für 5 min in 2xSSC und einmal in 1xPBS für 5 min gewaschen. Die Proben wurden nachfolgend für 10 min in Paraformaldehydlösung fixiert (1% Paraformaldehyd in 1xPBS), in 1xPBS gewaschen (2 mal 5 min), in einer Ethanolreihe dehydriert (70%, 90% und 100% für jeweils 2 min) und luftgetrocknet. Nachfolgend wurden die Präparate mit 15 µl Denaturierungspuffer (70% Formamid, 2xSSC, 50 mM Natriumphosphat) versetzt, mit

Deckgläsern abgedeckt, und der Ansatz für 2 min bei 75°C inkubiert. Die Deckgläser wurden nun entfernt und die Proben in eiskaltem 70%igen Ethanol für 2 min gewaschen anschließend wieder in der Ethanolreihe dehydriert und luftgetrocknet. 20-30 µl Hybridisierungsmix (100 ng DIG-markierte DNA-Probe in: 50% Formamid; 2xSSC; 50 mM Natriumphosphat pH 7,0; 10% Dextransulfat, 5 µg Lachsspermien-DNA) wurde für 10 min bei 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu der Probe gegeben. Die Präparate wurden mit einem Deckglas abgedeckt und für 18 h bei 37°C inkubiert. Die Post-Hybridisierung der Präparate erfolgte nach Entfernen des Deckglases für dreimal 5 min in 50% Formamid/2xSSC pH 7,0 bei 42°C, nachfolgend wurde dreimal 5 min mit 2xSSC gewaschen. Für die Immunocytochemische Detektion wurden die Präparate 30 min bei 37°C in 4M-Puffer (4xSSC, 5% Milchpulver) präinkubiert und anschließend der primäre Antikörper gegen Digoxigenin (1:100 in 4M-Puffer, anti-Schaf, Roche-Diagnostics, Mannheim) zugegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen der Präparate für 5 min in 4T-Puffer (4xSSC; 0,05% Tween-20) und zweimal 5 min in TNT-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in TNB-Puffer [100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% Milchpulver], Kaninchen-anti-Schaf, Rhodamin konjugiert, Acris Antibodies Hiddenhausen). Anschließend wurden die Proben in der Ethanolreihe dehydriert, luftgetrocknet und mit DAPI gegengefärbt.

Nachweis des myc-Fusionsproteins

Die Rosettenblätter von *Arabidopsis* wurden analog zum Nachweis von methylierter DNA fixiert und mit Cellulase verdaut, mit Essigsäure versetzt, in Trockeneis eingefroren und mit 1xPBS für 2 x 5 min gewaschen. Die Präinkubation erfolgte anschließend in Milchlösung (5% Trockenmilch in 1xPBS) für 30 min bei 37°C, danach wurde mit dem primären c-myc Antikörper (1:20 in 5% Trockenmilch, monoklonal Maus, DUNN Labortechnik, Asbach) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Präparate wurden mit 1xPBS für 3 x 5 min gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:100 in 1xPBS, Ziege-anti-Maus, Alexa 488 konjugiert, MOBITEC, Göttingen) für 1 h bei 37°C. Nach dem 3maligen Waschen mit 1xPBS für je 5 min erfolgte die Gegenfärbung der DNA mit DAPI.

Analyse von Histonmodifikationen

Für den immunocytologischen Nachweis von Histonmodifikationen wurde ein Stück eines jungen Rosettenblattes von *Arabidopsis* oder ein Stück Epidermis von *Scilla* auf einem Objekträger in 50 µl Fixierungslösung gelegt (4% Formaldehyd in 1xPBS) und mit Hilfe einer Rasierklinge fein zerkleinert. Die Suspension wurde mit einem Deckglas abgedeckt, gequetscht und die Präparate dann in flüssigen Stickstoff für ca. 20 sec eingefroren. Das Deckglas wurde anschließend abgesprengt und das Präparat 3 x 5 min in 1xPBS gewaschen. Die Präinkubation erfolgte in BSA-Lösung (1% BSA in 1xPBS), anschließend wurde mit dem primären Antikörper, mono-, di- und trimethyl H3K9, mono-, di- und trimethyl H3K27, mono-, di- und trimethyl H3K36, mono-, di- und trimethyl H4K20, dimethyl H3K4 sowie acetyl H3K9 (1:100 in 1% BSA, polyclonal anti-Kaninchen, AG T. Jenuwein, Wien bzw. BIOMOL Hamburg) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 1xPBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in 1xPBS, Ziege-anti-Kaninchen, Alexa 488 konjugiert, MOBITEC, Göttingen) für 1h bei 37°C. Nach dem 3maligen Waschen mit 1xPBS für je 5 min wurde die DNA mit DAPI gegengefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurde mit einem Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Anregungsfiltern über eine gekühlte CCD Kamera (PHOTOMETRIX, Fürstfeld-Bruck) aufgenommen. Die einzelnen Bilddateien wurden separat mit der Software Photoshop (ADOBE SYSTEMS, Unterschleißheim) bearbeitet.

2.2.22 Bisulfid-Sequenzanalyse

Für diese Analyse der DNA Methylierung wurden ca. 2 g genomische DNA von *Arabidopsis* mit *EcoRI* und dem entsprechenden Puffer über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurden 90 µl dieser DNA unter Zugabe von 10 µl tRNA (1 g/l Hefe-RNA, BOEHRINGER, Mannheim) und 11 µl 3M NaOH bei 42°C für 20 min denaturiert. Zur Behandlung der DNA mit Natriumbisulfid wurden dann 5,41 g Na-bisulfid (SIGMA ALDRICH, Deisenhofen) in 7 ml dest. Wasser gelöst, 0,5 ml Hydrochinon (2,2 g/l) und 400 µl 10 M NaOH zugegeben, die Lösung auf 10 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt, filtriert und 1200 µl dieser Lösung zu der vorbereitete DNA pipet-

tiert. Der Ansatz wurde mit 200 µl Mineralöl überschichtet und 1 h bei 95°C im Dunklen inkubiert. Anschließend erfolgte die Entsalzung der DNA mit einem Quiaex II-Kit (QUIAGEN, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers. Die DNA wurde in 105 µl 1 mM Tris-Cl (pH 8,0) eluiert, 100 µl davon mit 11 µl 3 M NaOH versetzt und für 20-50 min bei 37°C inkubiert. Die Neutralisation des Ansatzes erfolgte unterHinzufügung von 47 µl 10 M Ammoniumacetatlösung. Die DNA wurde dann unter Zugabe von 1 µl RNA (1 g/l Hefe-RNA) und 500 µl 96%igem Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert, 20 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, mit 70%Ethanol gewaschen, das Pellet luftgetrocknet, in 100 µl 1 mM Tris-Cl (pH 8,0) resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Analyse der Methylierung ausgewählter DNA-Bereiche erfolgte durch PCR-Amplifizierung mit spezifischen Primern und nachfolgender Klonierung der erhaltenen Fragmente in den Vektor pGEM[®]-3Zf(+). Nach der Transformation in den *E.coli* Stamm DH5α wurde die Plasmid-DNA von 20 Kolonien präpariert. Nach einem Kontrollverdau der Plasmide mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *PstI* wurden diese Proben in der Sequenzier-PCR mit T7 Primer für die automatischen Sequenzierung vorbereitet und anschließend ausgewertet.

2.2.23 Bioinformatik

Für die Datenbanksuche von DNA und Proteinen wurde BLASTN und BLASTP (www.tigrblast.org, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) verwendet. Für die Analyse von *Arabidopsis*-Genen die TAIR-Datenbank (*The Arabidopsis Information Resource*, www.arabidopsis.org) genutzt. Sequenzdaten wurden mit dem Programm BIOEDIT (*Biological sequence alignment editor for* WIN95/98/NT/2K/XP, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) analysiert. Für die Erstellung von Bilddateien wurden die Programme Corel Draw (COREL, Unterschleißheim) und Photoshop (ADOBE SYSTEMS, Unterschleißheim), für Tabellenkalkulationen und Textverarbeitung das Microsoft Office Paket (MICROSOFT, München) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Die Su(var)3-9 homologe Gene von *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis*-Gene, welche homolog zum *Drosophila* *Su(var)3-9*, zum humanen *SUV39H* und zu *CLR4* aus *Schizosaccharomyces pombe* sind, wurden zur Gruppe der *SUVH* Gene zusammengefasst. Insgesamt umfasst diese Gruppe 10 Gene (*SUVH1-SUVH10*), welche 4 verschiedenen Subgruppen zugeordnet werden können. Bis auf *SUVH4* weisen alle anderen *SUVH*-Genen keine Intronen im kodierenden Bereich auf. Dieses ist nicht nur in dicotylen Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana* der Fall, sondern auch in Monocotylen, wie *Pinus taeda*. Die hohe Anzahl von *SUVH*-Genen in Spermatophyten ist durch Retrotransposition und Duplikation von Genombereichen schon vor der Abtrennung der Angiospermen von den Gymnospermen zu erklären. Duplikationen treten insbesondere in Angiospermen häufig für verschiedene Genfamilien auf (Clegg et al., 1997; Lynch und Conery, 1997). Die Aufspaltung der *SUVH* Gene ist somit bereits in Gymnospermen, wie *Pinus taeda*, nachweisbar. In Bryophyten und Pteridophyten, wie *Physcomitrella patens* und *Ceratopteris richardii*, sind noch keine Subgruppen vorhanden (Abb. 2).

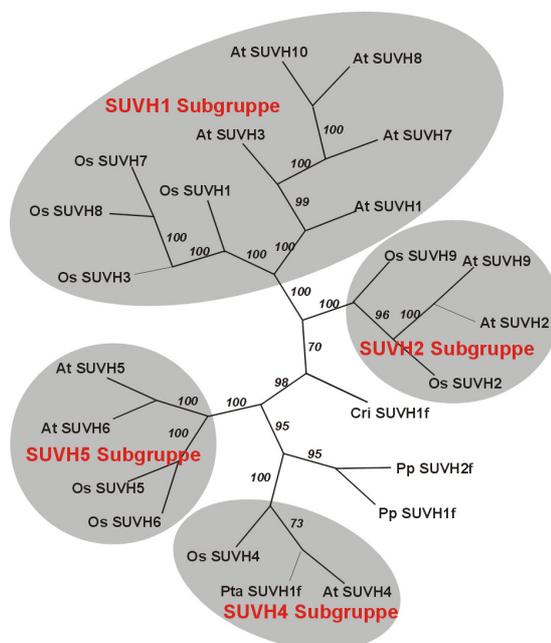


Abb. 2: Die *SUVH*-Gene in Angiospermen sind in 4 konservierte Subgruppen untergliedert. Phylogenetische Analyse der *SUVH*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Pinus taeda* (*Pta*), *Physcomitrella patens* (*Pp*) und *Ceratopteris richardii* (*Cri*, nach Krauss, pers. Mitteilung).

Die *SUVH*-Gene werden in *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Eine Ausnahme bildet dabei *SUVH8* und *SUVH10*, letzteres ein putatives Pseudogen, für welche keine Genexpression gezeigt werden konnte. Bei allen anderen *SUVH*-Genen konnte ein RNA-Transkript nachgewiesen werden (Baumbusch et al., 2001). Die Expression ist dabei nicht immer ubiquitär, sondern oft organspezifisch. So wurde das Transkript von *SUVH2* und *SUVH3* nur den grünen Organen, in Blätter sowie Infloreszenzen gefunden. Die *SUVH4* und *SUVH5* Transkripte waren in allen Organen außer der Wurzel nachweisbar. Für *SUVH1* waren die RNA-Transkripte in allen Organen zu finden. Dabei konnte die Expression von *SUVH1* als einziges untersuchtes *SUVH*-Gen auch in der Wurzel nachgewiesen werden (Abb. 3).

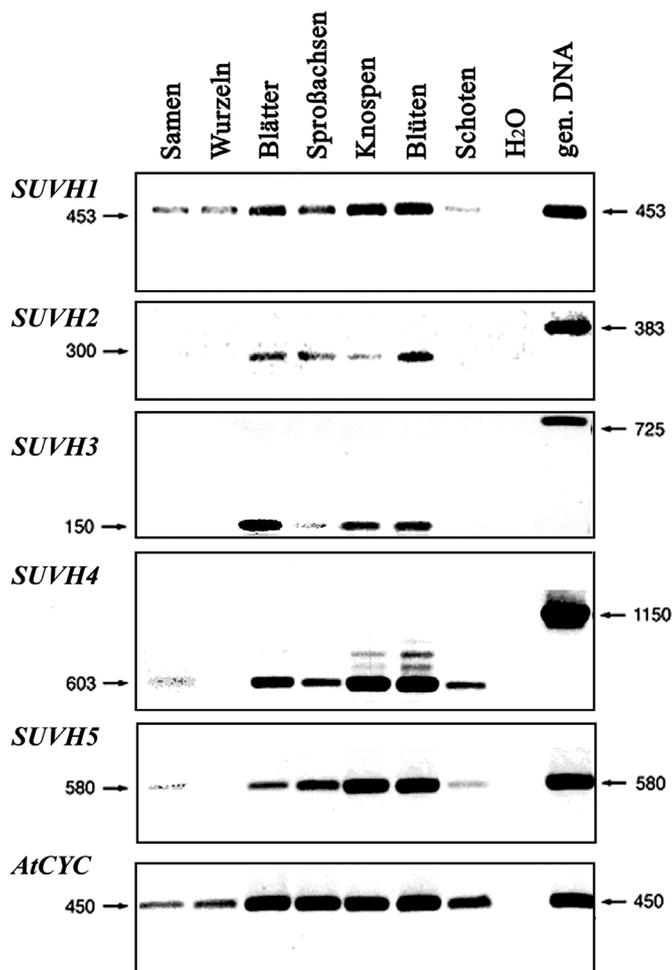


Abb. 3: RT-PCR Expressionsanalysen von *SUVH*-Genen aus *Arabidopsis*.

SUVH1 bis *SUVH5* aus verschiedenen Organen. Die RT-PCR Reaktion mit genspezifischen Primern für die Gene *SUVH1-SUVH5* sowie für *Cyclophilin* (Kontrolle) wurde an RNA-Isolationen aus gequollenen Samen, Wurzeln, Blättern, Sprossachsen, Knospen, Blütenorganen und grüne Schoten durchgeführt. Wasser sowie genomische DNA wurde als PCR Kontrolle verwendet (nach Baumbusch et al., 2001).

nachgewiesen werden (Naumann et al., 2005; Thorstensen et al., 2005). Vermutlich zeigen alle SUVH-Proteine eine solche Aktivität. Die hohe Sequenzhomologie im katalytischen Zentrum der SET-Domäne (Abb. 4) sind dafür ein wichtiger Hinweis.

3.2 Transiente Expressionssysteme und die Analyse der nukleären Verteilung von SUVH-Proteinen

Die transiente Expression von Proteinen in heterologen Systemen zur Identifizierung der zellulären Verteilung ist ein wichtiger Schritt bei der funktionellen Analyse von Chromatingenen. Neben den transienten Assay in Epidermiszellen von *Allium cepa* wurden Lokalisierungen von Chromatinproteinen in Interphasekernen von *Scilla mischtschenkoana* durchgeführt.

Bei der Sequenzanalyse der *SUVH*- und *SUVR*-Gene konnte in mehreren Genen eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz (Robbins et al., 1991) nachgewiesen werden. Dies betrifft *SUVH4*, *SUVH6* sowie *SUVR1*. Für *SUVH3*, *SUVH7* und *SUVH8* wurde eine AT-hook Domäne identifiziert (Abb. 1). Für Proteine mit einem solchen Proteinmotiv wurde eine Bindung an die kleine Furche von AT-reichen DNA-Sequenzen, u. a. in der Hefe *S. pombe*, gezeigt (Chuang et al., 1999). In den Proteinen *SUVH1*, *SUVH2*, *SUVH5*, *SUVH9* und *SUVH10* sowie in *SUVR2-SUVR5* wurden keine Kernlokalisierungsmotive mit einer spezifischen zweiteiligen Konsensussequenz (Robbins et al., 1991) identifiziert. Die Funktion des Kerntransportes kann hier auch durch andere einfache und multiple Kernlokalisierungssequenzen übernommen werden. Dies sind Sequenzen vom SV40 T-Antigen Typ mit kurzen Wiederholungen der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (Kalderon et al., 1984). Zum Nachweis der Kernlokalisierung von Proteinen wurden transiente Expressionsassays genutzt. Hierbei wurden die *GUS*- bzw. GFP-Fusionsproteine von *SUVH1*, *SUVH2*, *SUVH3* und *CLF* aus *Arabidopsis* sowie *SU(VAR)3-9* und *HP1* aus *Drosophila* transient in den Epidermiszellen von *Allium cepa* und *Scilla mischtschenkoana* nach dem Beschuss mit einer Partikelkanone exprimiert. Anhand der Lokalisierung des Fusionsproteins konnten dann Aussagen über eine zelluläre Verteilung der Proteine im Kern oder Zytoplasma gemacht werden. Als Kontrolle für die Lokalisierung der *GUS*-Fusionsproteine wurde zuerst das *GUS*-Gen im Vektor pKEX4tr-*GUS* in *Allium cepa* transient nach dem Bombardement exprimiert. Dabei war eine Blaufärbung nach der Anfärbung mit Färbelösung in der gesamten Zelle zu beobachten (Abb. 5A). Die *Drosophila* Proteine *SU(VAR)3-9* und *HP1* wurden als *GUS*-Fusionsproteine exprimiert und konnten nach

der Färbereaktion mit X-Gluc im Kern von *Allium cepa* lokalisiert werden. Als Vertreter der SET-Domänenproteine von *Arabidopsis* wurden SUVH1, SUVH2, SUVH3 und CLF als *GUS*-Fusionsproteine untersucht und konnten auch eindeutig als kernlokalisiert charakterisiert werden (Abb.5).

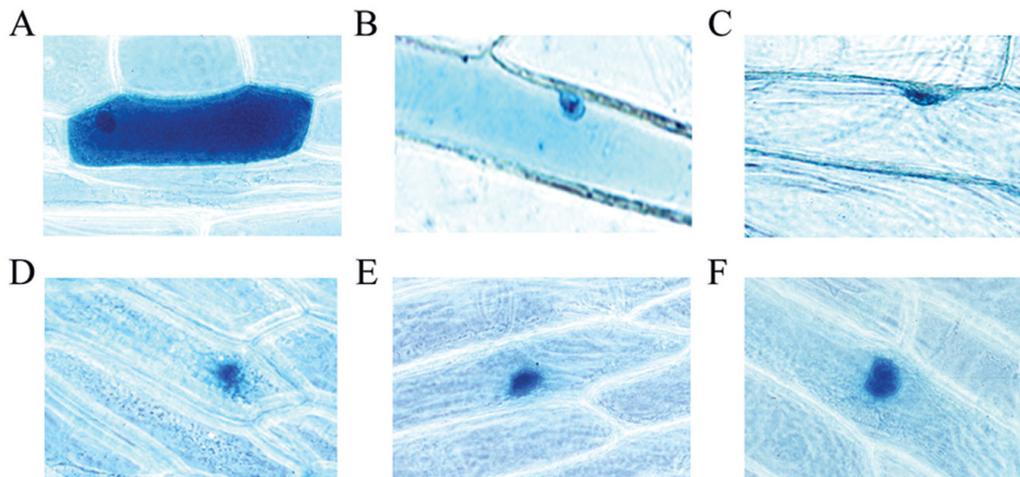


Abb. 5: Lokalisierung der *GUS*-Fusionsproteinen in Epidermiszellen von *Allium cepa*.

Das 35S::*GUS* Konstrukt wurde als Kontrolle verwendet und ist in der gesamten Epidermiszelle lokalisiert (A). Die Fusionsproteine SUVH1-*GUS* (B), SUVH2-*GUS* (C), CLF-*GUS* (D), SU(VAR)3-9-*GUS* (E) und HP1-*GUS* (F) sind im Zellkern von *Allium cepa* lokalisiert

Weiterhin wurde EGFP (GFP327) als Fusion mit den zu testenden Proteinen für die Kernlokalisierung verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine in den binären Vektor pKEx4tr-GFP vor das EGFP-Gen kloniert. Unter Kontrolle des 35S *CaMV* Promoters erfolgt die Expression des EGFP-Fusionsproteins. Zur Kontrolle erfolgte ein Bombardement mit dem EGFP327 Konstrukt im Vektor pKEx4tr-GFP. Nach transienter Expression in *Allium cepa* war nur im Zytoplasma eine GFP-Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 6). Als Kernproteine wurden SU(VAR)3-9 und HP1 aus *Drosophila* in *Allium cepa* transient als EGFP-Fusion exprimiert. SU(VAR)3-9-EGFP zeigt eine eindeutige Kernlokalisierung (Abb. 6). Im Kern wurde keine uniforme Verteilung des SU(VAR)3-9-EGFP Fusionsproteins, sondern eine Konzentration an Stellen gefunden, welche als heterochromatische Bereiche gedeutet werden können. Im Nucleolus wurde keine Fluoreszenz beobachtet (Abb. 6).

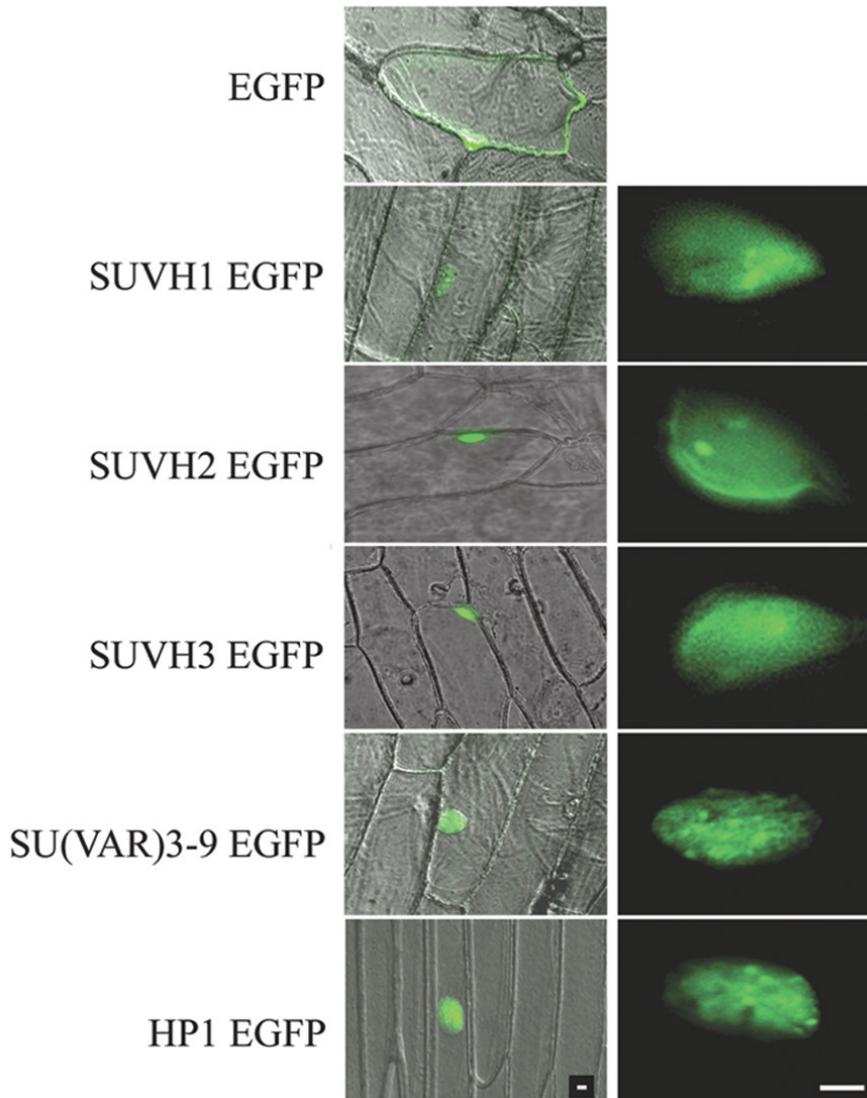


Abb. 6: Lokalisierungsexperiment von GFP-Fusionsproteinen in Epidermiszellen von *Allium cepa*. Die Kontrolle EGFP zeigt nur Fluoreszenz im Zytoplasma. Die Fusionsproteine SUVH1-EGFP, SUVH2-EGFP, SUVH3-EGFP, SU(VAR)3-9-EGFP und HP1-EGFP sind im Zellkern lokalisiert. Die Zellkerne mit GFP-Fusionsproteinen wurden heraus vergrößert (Balken = 10µm).

Exprimiert man das *Drosophila* HP1-EGFP Fusionsprotein, so erfolgt gleichfalls ein Transport in den Kern von *Allium cepa*. Ähnlich wie bei SU(VAR)3-9-EGFP sind auch hier Bereiche zu erkennen, die eine stärkere GFP-Fluoreszenz zeigen. Dies deutet auf eine vorrangige Lokalisierung von HP1-EGFP in den heterochromatischen Bereichen des Kerns hin (Abb. 6). SU(VAR)3-9 und HP1 sind auch in *Drosophila* vorrangig in den heterochromatischen Bereichen assoziiert (Schotta et al., 2002). Dies belegen cytologische Untersuchungen, welche u. a. an Speicheldrüsenkernen durchgeführt worden sind. Die Lokalisierung dieser Proteine in den Nuklei von *Allium cepa* und insbesondere auch in *Scilla mischtschenkoana* deuten darauf hin, dass die heterochromatische Assoziation von Su(var)3-9 und HP1 ein konservierter Prozess ist.

Auch die EGFP-Fusion des SUVH1-Proteins aus *Arabidopsis* war in *Allium*-Kernen in den heterochromatischen Bereichen konzentriert. In den Nukleoli wurde keine Fluoreszenz gefunden. SUVH2-EGFP zeigt in *Allium*-Kernen einige stärker fluoreszierende Bereiche, welche mit den Chromozentren assoziiert werden könnten (Abb. 6). Bei SUVH3-EGFP wurde eine uniforme Verteilung im *Allium*-Kern beobachtet. Von diesem Protein kann von einer euchromatischen Lokalisierung aufgrund der AT-hook Motive ausgegangen werden. Analysen mit dem SUVH3-EGFP Protein in *Scilla mischtschenkoana* untermauern diese Befunde (Abb. 8).

In *Allium cepa* sind die heterochromatischen Bereiche eher diffus im Zellkern verteilt. Ähnliche Verteilungen wurden z. B. in *Hordeum vulgare* gefunden. Im Gegensatz dazu wird in vielen anderen Pflanzenarten, wie in *Marchantia polymorpha*, *Ornithogalum longibracteatum*, *Scilla mischtschenkoana* sowie in *Arabidopsis thaliana* eine Verteilung der heterochromatischen Bereiche beobachtet, die vorrangig auf die Chromozentren konzentriert ist (Abb. 7 und 8).

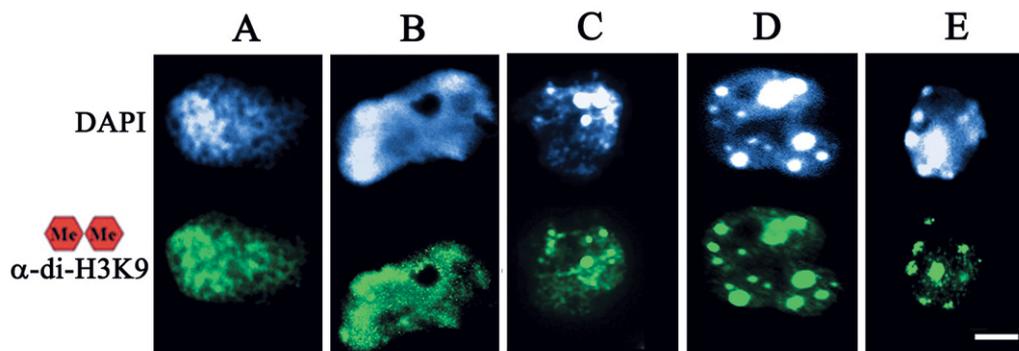


Abb. 7: Unterschiedliche Verteilung des Heterochromatins in Interphasekernen von Pflanzenarten. Diffuse Verteilung in *Hordeum vulgare* (A) und *Allium cepa* (B). Konzentration des Heterochromatins in den Chromozentren von *Marchantia polymorpha* (C), *Ornithogalum longibracteatum* (D) und *Arabidopsis thaliana* (E). Die Kerne wurden mit Antikörpern gegen den heterochromatischen Marker dimethyl-H3K9 gefärbt (Balken = 10 μ m).

Um genauere Aussagen über die Lokalisierung von Proteinen im Chromatin zu machen, wurden die Chromatingene zusätzlich zu *Allium cepa* in den Kernen von *Scilla mischtschenkoana* exprimiert. Neben dem Assay in *Allium cepa* stellen Interphasekerne von *Scilla mischtschenkoana* ein interessantes Modellsystem für die Analyse der Lokalisierung heterochromatischer Proteine dar. *Scilla mischtschenkoana* bietet den Vorteil, daß hier das Heterochromatin im Interphasekernen nach der Anfärbung mit DAPI mikroskopisch gut sichtbar vorliegt (Schweizer, 1983; Berger und Greilhuber, 1993). Immunocytologische Analysen mit Antikörpern gegen dimethyl-H3K9, einem

heterochromatischen Marker in Pflanzen, zeigen gleichfalls starke Markierungen an den Chromozentren (Abb. 8A).

Nach Expression der EGFP-Fusion des *Drosophila* HP1 konnte eine klare Lokalisierung dieses Proteins in den heterochromatischen Bereichen des Nukleus von *Scilla* beobachtet werden (Abb. 8B). Auch für das SUVH2-EGFP Fusionsprotein konnte eine solche Verteilung gezeigt werden (Abb. 8C). SUVH3-EGFP ist mehr diffus (euchromatisch) verteilt (Abb. 8D). Die SUVH1-GFP Verteilung wurde nicht untersucht.

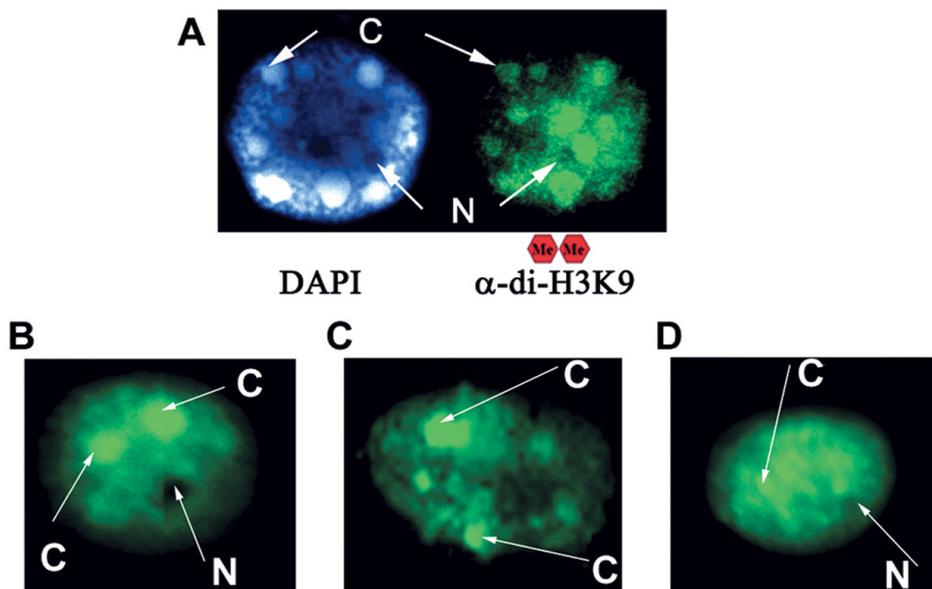


Abb. 8: Lokalisierungsanalysen in den Interphasekernen von *Scilla mischtschenkoana*.

Immunologische Färbung eines Interphasekerns mit Antikörper gegen dimethyliertes H3K9 und Gegenfärbung mit DAPI zur Detektion der Chromozentren *C* und Nukleoli *N* (A). Die Lokalisierung des HP1-EGFP Fusionsproteins erfolgt vor allem in den Chromozentren (B). Das SUVH2-EGFP Fusionsproteins ist ebenfalls überwiegend in den Chromozentren lokalisiert (C). SUVH3-EGFP wird sowohl in den Chromozentren, als auch außerhalb dieser Regionen gefunden (D).

Nachdem eine eindeutige Lokalisierung der *GUS*-und EGFP-Fusionsproteine von SUVH1 und SUVH2 im Zellkern von *Allium cepa* sowie in den heterochromatischen Bereichen von *Scilla mischtschenkoana* nach der transienten Expression gezeigt wurde, standen Untersuchungen im eigentlichen Herkunftsorganismus dieser SET-Domänenproteine, *Arabidopsis thaliana*, an.

3.3 Die SU(VAR)3-9 Homologen SUVH1 und SUVH2 sind Heterochromatin-assoziierte Proteine, Transgen-Analyse zur Heterochromatinbindung von SUVH-Proteinen

Zur Analyse der Funktion von pflanzlichen SET-Domänenproteinen wurden stabile transgene Pflanzenlinien hergestellt. Dabei wurden die Proteine SUVH1 und SUVH2 ausgewählt, beides Vertreter zweier unterschiedlicher Subgruppen von SET-Domänenproteinen. Von *SUVH1* und *SUVH2* wurden die myc- und EGFP-Fusionsproteine beider Gene in *Arabidopsis* unter Kontrolle des *35S**- bzw. des induzierbaren *GVG*-Promoters exprimiert. Zur Analyse evolutionär konservierter Funktionen und Lokalisierungen im Chromatin von *Arabidopsis* wurden die *Drosophila* Heterochromatinproteine HP1 und SU(VAR)3-9 als myc-Fusionsproteine, ebenfalls unter Kontrolle des *35S**-Promoters, exprimiert. Mit Hilfe von Antikörpern gegen den myc-Fusionsanteil bzw. unter Anregung der Fluoreszenz des EGFP-Fusionsanteils wurde dann die Lokalisierung der Proteine im Nukleus von *Arabidopsis* analysiert. In *Arabidopsis*-Interphasekernen sind nach Anfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI hell leuchtende Strukturen (Chromozentren) sichtbar. In diesen Chromozentren befinden sich vor allem zentromere 180bp DNA-Repeats (core repeats, Abb. 9), welche von pericentrischen Heterochromatin, Transposons und anderen Repeats flankiert sind (Fransz et al., 2000; Haupt et al., 2001).

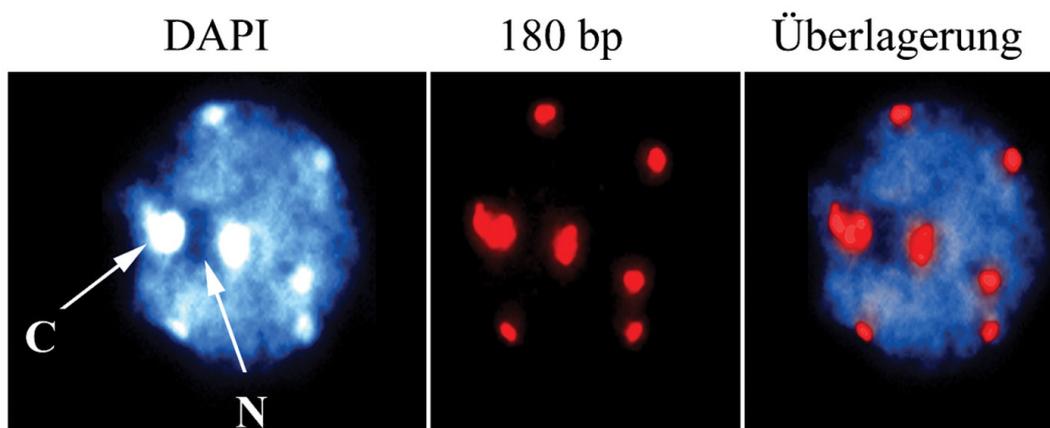


Abb. 9: Isolierte Interphasekerne aus *Arabidopsis thaliana*, Ecotyp Columbia.

Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die heterochromatischen Bereiche (C=Chromozentren) sind als hellblaue Zentren, die Nucleoli (N) als dunkel gefärbte Bereiche zu beobachten. In den Chromozentren sind 180 bp-Repeats zu finden. FISH-Analysen unter Verwendung einer 180 bp-Sonde.

In Übereinstimmung mit der Chromosomenzahl von $2n=10$ in diploiden Interphasekernen von *Arabidopsis* sind dementsprechend maximal 10 Chromozentren nach der Anfärbung mit DAPI zu beobachten. Die Nucleoli treten als dunkle Bereiche in den Kernen hervor. Sind die untersuchten Fusionsproteine mit den Chromozentren colokalisiert, deutet dies auf eine Assoziation mit dem Heterochromatin hin. Zusätzlich zu den beiden zu untersuchenden *Arabidopsis*-Proteinen SUVH1 und SUVH2 wurde auch die Verteilung der beiden *Drosophila*-Heterochromatinproteine SU(VAR)3-9 und HP1 untersucht (Abb. 10).

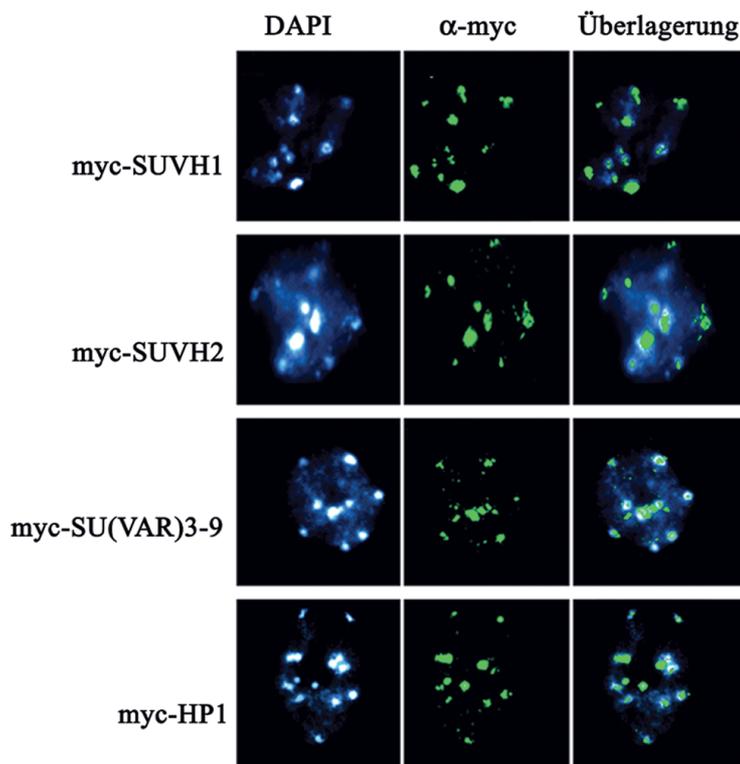


Abb. 10: Lokalisierung von Chromatinproteinen in *Arabidopsis*-Interphasekernen.

Die Proteine SUVH1, SUVH2, SU(VAR)3-9 und HP1 sind überwiegend in den Chromozentren lokalisiert. Immunocytoologische Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen den myc-Fusionsanteil.

Alle untersuchten Chromatinproteine wurden als myc-Fusionen in den Chromozentren der *Arabidopsis*-Zellkerne beobachtet. Die SU(VAR)3-9 Homologen SUVH1 und SUVH2 sind somit Heterochromatin-assoziierte Proteine.

3.3.1 Überexpression von *Drosophila* HP1 in *Arabidopsis*

In *Arabidopsis* wurden 12 transgene Linien erzeugt, welche das *Drosophila* HP1-Protein als myc-Fusionsprotein stabil exprimierten. Davon zeigten 4 Linien einen Phänotyp, der als homeotische Transformation der Blütenorgane beschrieben werden kann (Abb. 11). Im Vergleich zum Wildtyp von *Arabidopsis* mit der Blütenformel $K_{2+2} C_4 A_{2+4} G_{(2)}$ beobachtet man in den transgen HP1 exprimierenden Linien #1, #4, #5 und #11 einen Blütenphänotyp mit der Blütenformel $K_{2+2} C_4 \rightarrow K_4 A_{2+4} \rightarrow G G_{(2)}$. Somit sind die Blütenblätter (C) zu Kelchblättern (K) und die Antheren (A) zu Gynözeen (G) transformiert (Abb. 11). Blütentransformationen dieser Art findet man für Mutationen der homeotischen Blütenentwicklungsgene *APETALA3* (*AP3*) und *PISTILLATA* (*PI*). Diese MADS-Box Proteine sind für die Identität der Blütenorgane mitbestimmend. Dabei sind AP3 und PI in die Entwicklung der Blütenwirtel 2 und 3 involviert (Jack et al., 1992; Goto et al., 1994). Mutationen für *AP3* und *PI* führen zu einer Veränderung der Blütenmorphologie (Abb. 11).

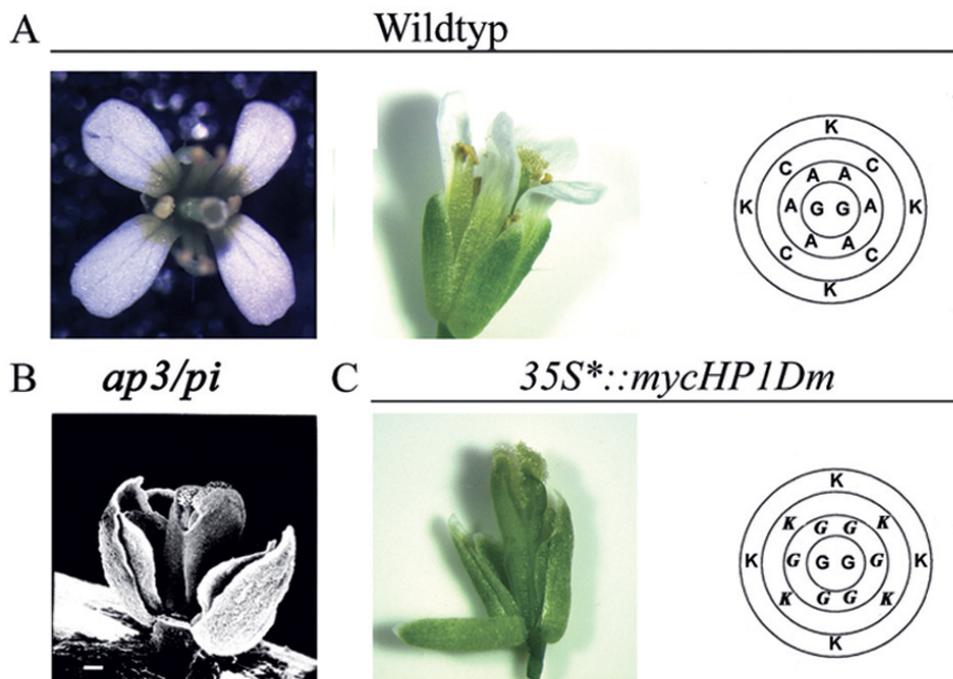


Abb. 11: Überexpression von *Dm*HP1 in *Arabidopsis* führt zur homöotischen Transformation. Wildtypblüte von *Arabidopsis* mit Blütendiagramm (A). Der *ap3/pi*-Phänotyp (B, aus Meyerowitz et al., 1994). Blüten von myc-HP1 transgenen Pflanzen mit homöotischer Transformation zeigen ebenfalls einen *ap3/pi* Phänotyp (C).

Diese homeotische Transformation wurde auch nach Überexpression von *HP1Dm* beobachtet. Das homologe Protein zu *HP1Dm* in *Arabidopsis*, *TERMINAL FLOWER 2*, ist an der Regulation wichtiger Blütenentwicklungsgene beteiligt. In Mutanten für *TERMINAL FLOWER 2* wurde eine Hochregulierung der Transkription von *AP3* und *PI* analysiert. TFL2 wirkt somit als Repressor für *AP3* und *PI* (Kotake et al., 2003). Die Supprimierung von *AP3* und *PI* nach *HP1Dm* Überexpression lässt auf eine funktionelle Redundanz zu TFL2 schließen.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den beobachteten phänotypischen Effekten nach *DmHP1* Überexpression nicht um eine Insertion des *35S::mycHP1* Konstruktes in die Targetgene *AP3* oder *PI* handelt, wurde deren Transkription unter Zuhilfenahme der RT-PCR mit genspezifischen Primern überprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, daß *AP3* und *PI* in *35S::mycHP1*-Linien weiterhin exprimiert werden. (Abb. 12). Die Expression ist aber geringer als in der untersuchten Wildtypkontrolle. Die Repression von *AP3* und *PI* beruht offensichtlich auf der Wirkung der zu TFL2 homologe Funktion von *DmHP1*.

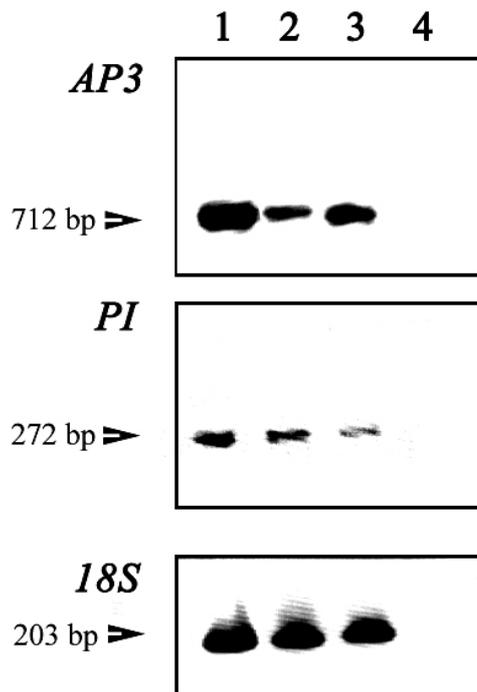


Abb. 12: RT-PCR Expressionsanalyse von *AP3* und *PI* in *35S::myc-HP1* Linien.

Die RT-PCR Reaktion wurde mit genspezifischen Primern für *AP3* und *PI* sowie für 18SrDNA als Kontrolle an RNA aus Wildtyp (1) und den transgenen Linien *35S::mycHP1#4-3* (2) und *35S::mycHP1#10-1* (3) durchgeführt. Als Kontrolle wurde Wasser verwendet (4).

Um Aussagen über eine Lokalisierung des HP1 Proteins in den *Arabidopsis* Kernen zu machen, wurden Antikörperfärbungen gegen den myc-Fusionsanteil des transgen

exprimierten myc-HP1 Proteins vorgenommen. Das HP1-Protein ist überwiegend in den heterochromatischen Bereichen (Chromozentren) der *Arabidopsis*-Interphasekerne zu finden (Abb. 13).

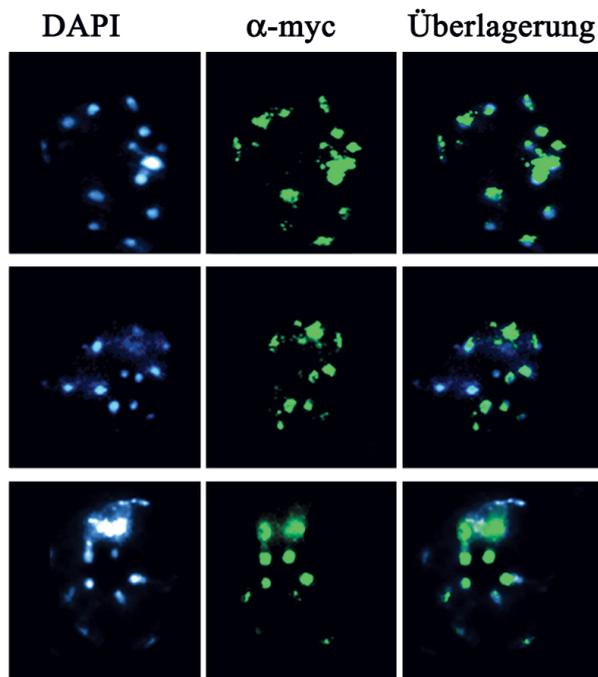


Abb. 13: Lokalisierung von myc-HP1 in Interphasekernen von *Arabidopsis thaliana*.

Das myc-HP1 Fusionsprotein ist überwiegend in den Chromozentren lokalisiert. Immunocytoologische Färbung mit Antikörpern gegen den myc-Fusionsanteil.

Dabei war in der Lokalisierung von myc-HP1 die Färbung ausschließlich in den Chromozentren lokalisiert. Eine Verteilung außerhalb des perizentrischen Heterochromatins wurde nicht beobachtet.

3.3.2 Expression von *Drosophila* SU(VAR)3-9 in *Arabidopsis thaliana*

Für das heterochromatin-assoziierte Protein SU(VAR)3-9 aus *Drosophila* wurden 12 transgene Linien in *Arabidopsis* hergestellt. In allen $35S::mycSU(VAR)3-9$ Linien waren keinerlei signifikante phänotypische Veränderungen sichtbar.

In transgenen $35S::mycSU(VAR)3-9$ Pflanzen wurde unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen den myc-Fusionsanteil die Verteilung des Fusionsproteins in den Interphasekernen untersucht (Abb. 14).

Das SU(VAR)3-9 Protein wird überwiegend in den heterochromatischen Bereichen (Chromozentren) der *Arabidopsis*-Kerne gefunden. In einigen Kernen ist jedoch auch eine Lokalisierung außerhalb der Chromozentren beobachtet worden.

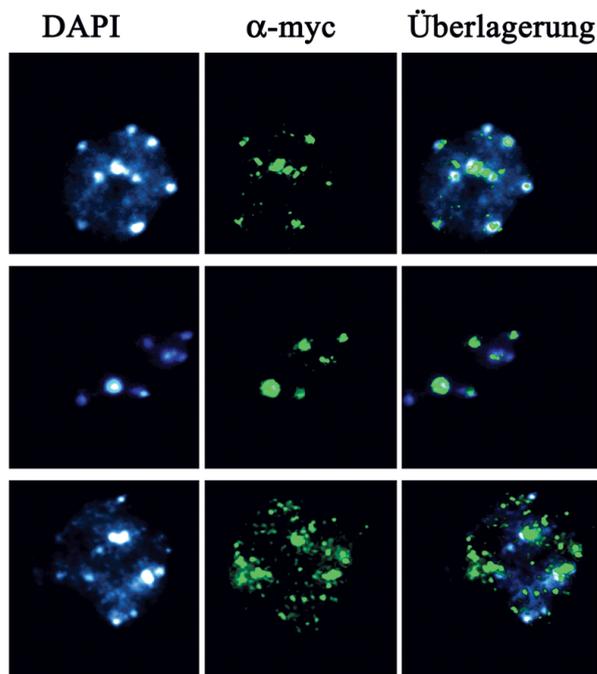


Abb. 14: Lokalisierung von myc-SU(VAR)3-9 in *Arabidopsis*-Interphasekernen.

Das myc-SU(VAR)3-9 Fusionsprotein ist überwiegend in den heterochromatischen Bereichen zu finden. Immunocytologische Färbung mit Antikörpern gegen den myc-Fusionsanteil.

3.3.3 Überexpression von *SUVH1* in *Arabidopsis thaliana*

Als Vertreter der *SUVH1* Subgruppe der *SUVH*-Genfamilie wurde das *SUVH1*-Gen als myc-Fusionsprotein unter Kontrolle des *CaMV 35S**-Promoters sowie als EGFP-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des induzierbaren *GVG*-Promoters in *Arabidopsis* exprimiert. Dabei wurden 12 transgene Pflanzenlinien für *35S*::mycSUVH1* sowie für *GVG::SUVH1-EGFP* hergestellt. Nach Überexpression unter dem konstitutiven *CaMV 35S**-Promoter wurden in 9 Linien unterschiedliche (pleiotrope) Phänotypen festgestellt, welche eine Veränderung des Wurzelphänotyps betrafen. So kam es nach Überexpression von *SUVH1* zu einer signifikanten Verlängerung der Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15).

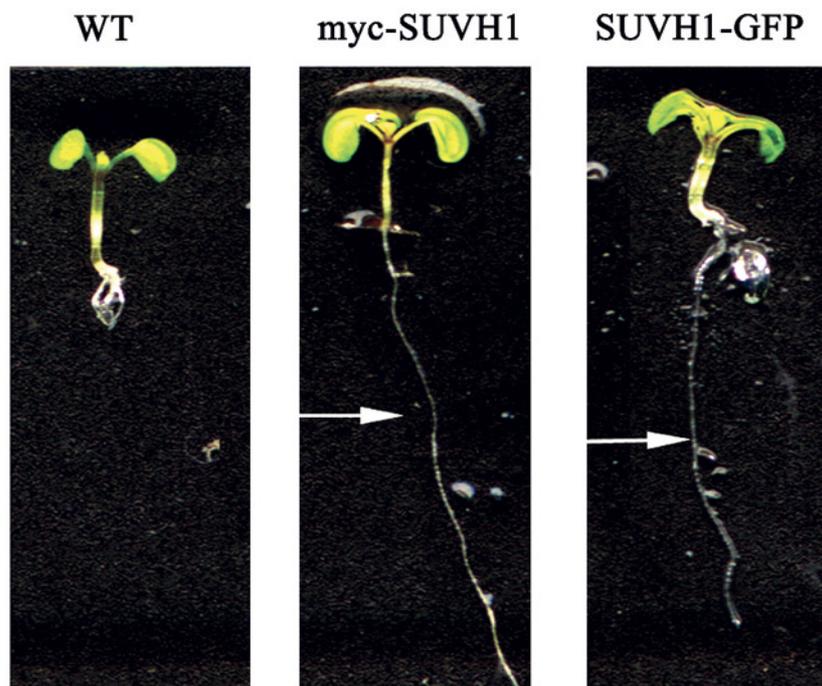


Abb. 15: Keimlinge von transgenen *35S*::mycSUVH1* und *GVG::SUVH1* Linien.

Nach Überexpression von *SUVH1* ist eine Verlängerung der Primärwurzeln im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten .

Betrachtet man die Wurzelhaare der transgenen *SUVH1*-Linien, so ist eine knollige Verdickung dieser Organe auffällig. Diese Veränderungen der Wurzel sind nicht nur in den *SUVH1* Linien mit konstitutiven *35S*CaMV* Promoter, sondern auch nach induzierter Expression unter Kontrolle des *GVG* Promoters zu beobachten. Dieser Phänotyp wurde auch bei Doppelmutanten für die Wurzelentwicklung *rhd1*, *rhd3* sowie *rhd1*, *rhd4* beobachtet (Abb. 16). Die Gruppe der *RHD*- (*root hair development*) Gene

ist in die Morphogenese der Wurzelhaare in *Arabidopsis* involviert (Schiefelbein und Somerville, 1990).

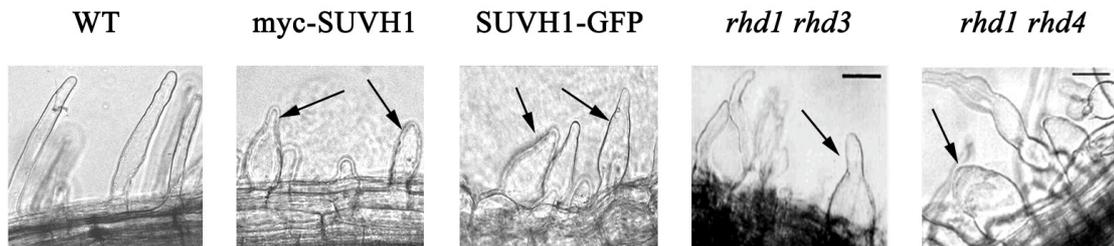


Abb. 16: Veränderung des Phänotyps der Wurzelhaare in transgenen *SUVH1*-Linien.

Nach konstitutiver sowie induzierter Überexpression von *SUVH1* wurde eine knollige Veränderung der Wurzelhaarform beobachtet (Pfeile). Dieser Phänotyp wurde auch in *rhd1 rhd3* sowie in *rhd1 rhd4* Doppelmutanten gezeigt (Mutanten nach Schiefelbein und Somerville, 1990, Balken=50µm).

Zum Nachweis der spezifischen Expression in Gewebe wurden Konstrukte hergestellt, welche das *GUS*-Reportergen unter Kontrolle des spezifischen *SUVH1*-Promoters exprimierten. Die Expression von *SUVH1* startet bereits im frühen Embryo. Ein Imprinting der *SUVH1*-Genexpression ist dabei sehr wahrscheinlich, da nur das maternale Gen exprimiert wird (P. Grini, persönl. Mitteilung). Eine *GUS*-Färbung ist bereits im globulären Embryostadium ab der 2. Teilung zu beobachten. Hierbei ist die Suspensorregion sowie die Chalaza des Embryogewebes gefärbt. Im späteren Herz- und Torpedostadium des Embryos war eine Ausbreitung der Färbung über den gesamten Embryo zu beobachten (Abb. 17). In Keimlingen ist eine *SUVH1::GUS* Expression in der Wurzelspitzenregion zu sehen. In älteren Keimlingen ist auch das Leitgewebe gefärbt, wobei hier auch eine Diffusion bzw. Transport des *GUS*-Färbeproduktes die Ursache sein könnte (Abb. 17).

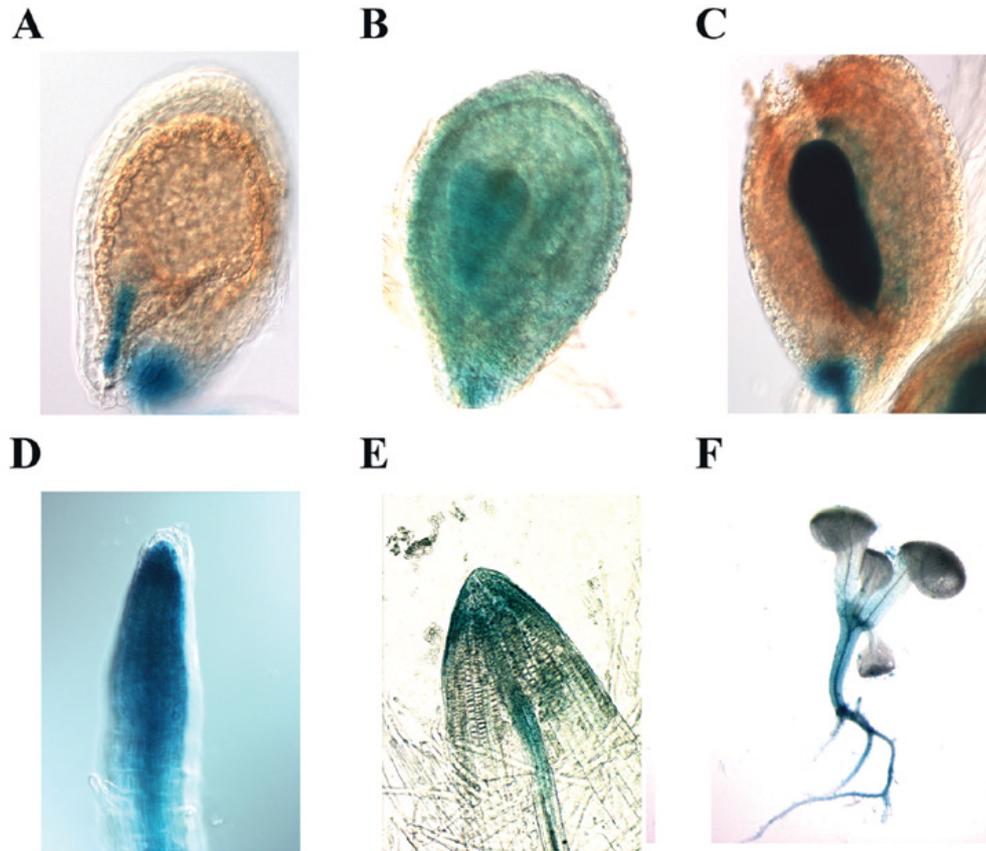


Abb. 17: Expression des *SUVH1::GUS* Konstruktes in *Arabidopsis thaliana*.

Die Expression ist bereits im frühen Embryonalstadium in den Suspensorzellen nachweisbar (A). Später sind Herz-sowie Torpedostadium des Embryos gefärbt (B, C, P. Grini, pers. Mitteilung). In Keimlingen erfolgt eine *SUVH1::GUS* Expression dann vorwiegend in den Wurzelspitzen (D, E), später in der gesamten Wurzel (F).

Zum Nachweis der Verteilung des SUVH1-Proteins in der Zelle von *Arabidopsis* wurde eine EGFP-Fusion von SUVH1 unter Kontrolle des mit Dexamehason induzierbaren *GVG*-Promoters genutzt. Dieses *GVG::SUVH1-EGFP* Konstrukt wurde cytologisch anhand der GFP-Fluoreszenz bei 327 nm Wellenlänge nachgewiesen (Abb. 18). Bereits in Keimlingen transgener SUVH1-EGFP Linien war eine GFP-Fluoreszenz in den Kernen der Wurzel nachweisbar. Das SUVH1-EGFP Fusionsprotein wurde in den Chromozentren der Zellkerne vorgefunden (Abb.18).

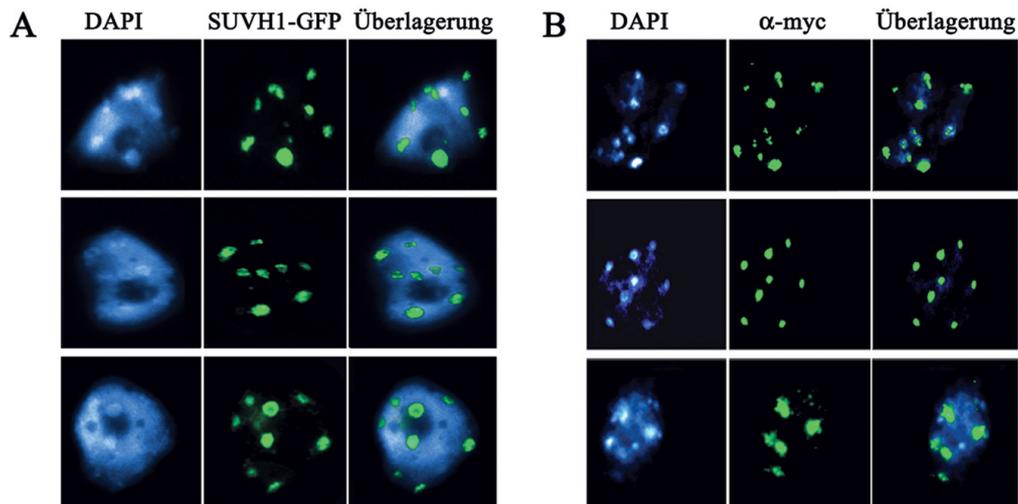


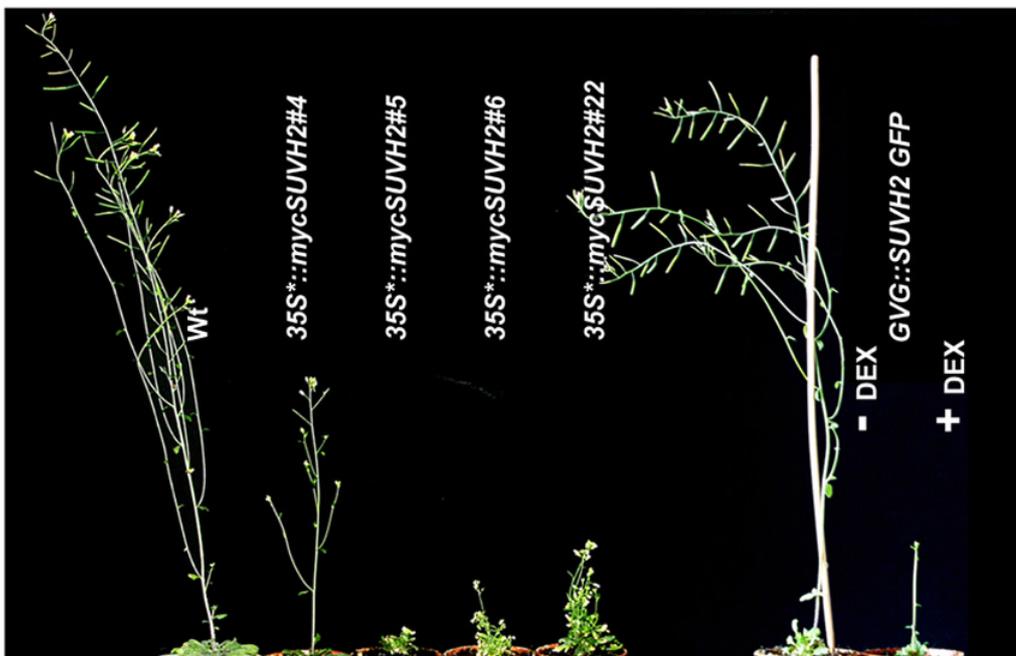
Abb. 18: Lokalisierung von SUVH1-EGFP und myc-SUVH1 in den Kernen von *Arabidopsis*. Das SUVH1-EGFP Fusionsprotein ist überwiegend in den heterochromatischen Bereichen zu finden (A). Nach Immunocytologischer Analyse unter Verwendung eines myc-spezifischen Antikörpers wurde eine Assoziation von myc-SUVH1 in den heterochromatischen Bereichen des Zellkerns festgestellt (B).

Ebenfalls wurde die Verteilung des myc-SUVH1 Fusionsproteins untersucht. Diese Lokalisierungen korrelieren mit der Verteilung des EGFP-fusionierten SUVH1 Proteins im Heterochromatin (Abb. 18).

3.3.4 Ektopische Chromatinbindung nach Überexpression von *SUVH2*

Zur Analyse der dosisabhängigen Wirkung des SUVH2-Proteins wurden Konstrukte unter konstitutiver Promoterkontrolle, *35S*::mycSUVH2*, sowie für induzierte Expression, *GVG::SUVH2-GFP*, in *Arabidopsis* transformiert. Ebenfalls wurden Anti-sense-Konstrukte von *SUVH2*, *35S*::SUVH2as*, zur Analyse von Effekten nach dem Verlust des endogenen Transkriptes hergestellt (K. Naumann, pers. Mitteilung). Nach der Expression unter *35S**-Promoter wurden von den insgesamt 24 transgenen Linien 3 Linien gefunden, welche einen „mini-plant“-Phänotyp zeigten (Abb. 19A).

A



B

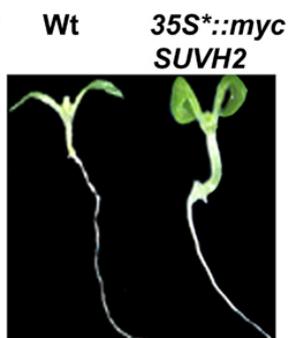


Abb. 19: Die Überexpression von *SUVH2* führt zu einem dosisabhängigen „mini-plant“-Phänotyp. Die *SUVH2*-Linien #5, #6 und #22 zeigen einen signifikanten „mini-plant“-Phänotyp, der in Linie #4 nur schwach ausgeprägt ist. Der „mini-plant“-Phänotyp wurde auch nach induzierter Expression des *GVG::SUVH2*-Konstruktes mit Dexamethason beobachtet (A). Nach Überexpression von *SUVH2* wird außerdem ein „curled“-Kotyledonen-Phänotyp beobachtet (B, Naumann et al., 2005).

Dieser äußert sich in drastischen Entwicklungsdefekten, wie einer Reduktion der Sprossachse, der Blattgröße und –anzahl sowie einer stark herabgesetzten Fertilität. Dabei führt offenbar auch die Verminderung der Zellgröße zu dem morphologischen Phänotyp, welcher in den Linien #5, #6 und #22 beobachtet wurde. In den Überexpressionslinien wurde außerdem eine Veränderung der Morphologie der Kotyledonen festgestellt (Abb. 19B), ein Effekt, welcher hilfreich bei der Isolierung von Suppressormutanten für das *SUVH2*-Transgen war (Naumann et al., 2005).

Durch Bestimmung des Insertionsortes des *SUVH2*-Transgenes über Southernblots und inverse PCR-Analysen wurde festgestellt, daß es sich bei den Linien mit den „mini-plant“-Phänotyp um unabhängige Insertionen handelt. Dabei erfolgte die Insertion in Regionen, die für die Ausprägung dieses „mini-plant“-Phänotyps nicht relevant sind (K. Naumann, pers. Mitteilung). Der „mini-plant“-Phänotyp ist abhängig von der Proteinmenge. Dieses konnte anhand von Western-Analysen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen den myc-Fusionsanteil des myc-SUVH2 Konstruktes gezeigt werden (Abb. 20). Dabei wiesen die Linien #5, #6 und #22 eine deutlich erhöhte Konzentration von myc-SUVH2 auf, in Linie #4 war weniger myc-SUVH2 Protein nachweisbar.

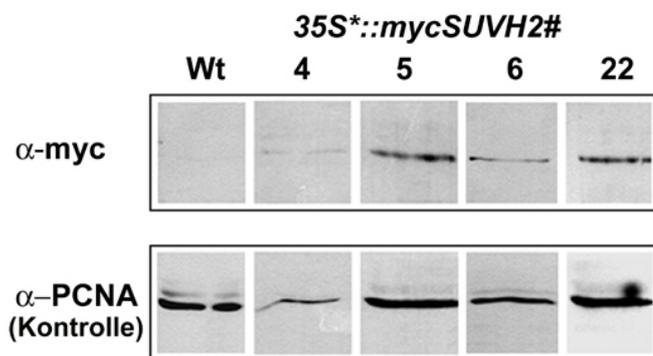


Abb. 20: Der „mini-plant“-Phänotyp ist abhängig von der Proteindosis.

Der „mini-plant“-Phänotyp nach *SUVH2* Überexpression korreliert mit der Menge an transgenen myc-SUVH2 Protein. Nachweis des myc-SUVH2 Fusionsproteins im Westernblot mit spezifischen c-myc Antikörper.

Betrachtet man die Lokalisierung des SUVH2-Proteins in den Kernen der Linien #5, #6 und #22, so ist neben der Lokalisierung in den heterochromatischen Bereichen eine Antikörperfärbung auch außerhalb dieser Regionen sichtbar (Abb. 21A).

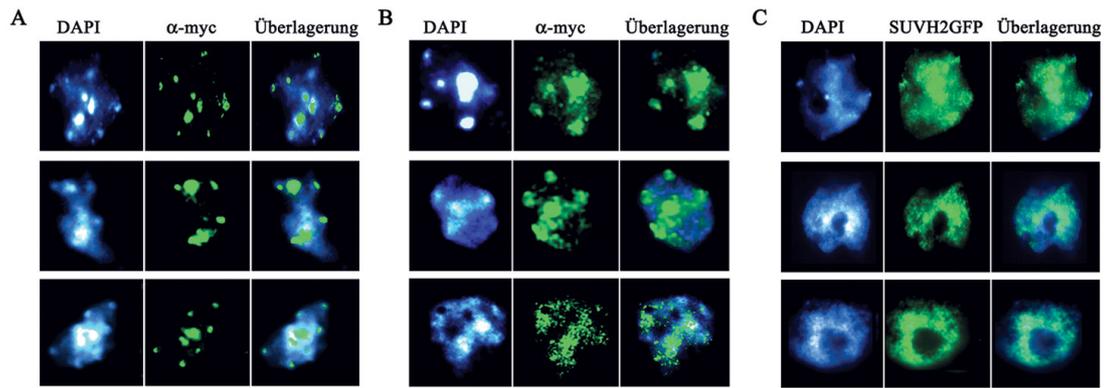


Abb. 21: Das myc-SUVH2 Fusionsprotein ist im Heterochromatin assoziiert und ektopisch verteilt. Immunocytoologische Analysen von Interphasekernen der Linie *35S*::mycSUVH2#4* zeigen normale Verteilung des Fusionsproteins in den Chromozentren (A). In der Linie *35S::mycSUVH2#5* ist eine ektopische Verteilung des Fusionsproteins zu beobachten (B). In SUVH2-EGFP Linien erfolgt ebenfalls eine ektopische Verteilung des Fusionsproteins im Zellkern (C).

Dabei kann von einer ektopischen Verteilung des myc-SUVH2 Fusionsproteins ausgegangen werde. Diese Verteilung wurde hauptsächlich in den Linien mit erhöhter myc-SUVH2 Proteinmenge gefunden (Abb. 21B). Nach induzierter Überexpression wurde ebenfalls eine ektopische Verteilung des SUVH2-EGFP Fusionsproteins im Zellkern beobachtet (Abb. 21C).

3.4 Histon-Methyltransferaseaktivität von SUVH1 und SUVH2

3.4.1 *In vitro*-Analysen zur HMTase-Aktivität von SUVH1 und SUVH2

Von den *Arabidopsis* SET-Domänenproteinen aus der SUVH-Gruppe wurde eine Histon-Methyltransferaseaktivität für das Histon H3 an der Position Lysin 9 zuerst aufgrund der funktionellen und strukturellen Homologie zu dem *Drosophila* SU(VAR)3-9 Protein postuliert. Rekombinantes *Dm*SU(VAR)3-9 ist *in vitro* in der Lage, Histon H3 und auch das N-terminale Histon H3-Peptid (AS 1-20) zu methylieren (Abb. 22).

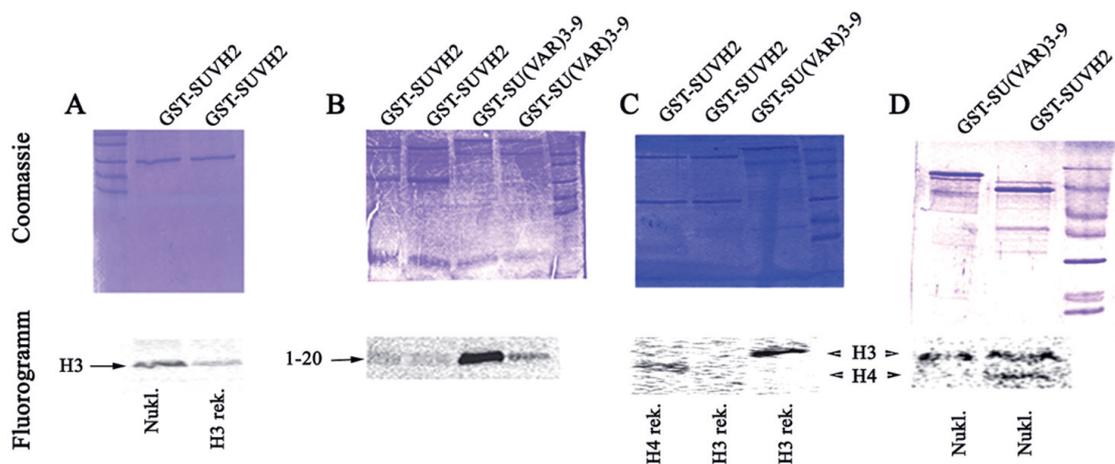


Abb. 22: Das SUVH2 Protein ist eine Histon-Methyltransferase für H3 und H4.

Methyltransferase *in vitro*-Assays mit rekombinanten H3 und H4, H3-Peptiden (AS 1-20) sowie rekonstituierten Nukleosomen als Substrat. Nukleosomen als Substrat werden von der HMTase SUVH2 besser methyliert als rekombinantes H3 (A). Synthetisch hergestellte H3 Peptide (AS 1-20) zeigen nur schwache Aktivität, SU(VAR)3-9 wurde als Kontrolle verwendet (B). Auch das rekombinante H4 als Substrat reagiert nur schwach (C). An Nukleosomen ist eine Aktivität bei H3 und H4 zu beobachten, SU(VAR)3-9 wurde als Kontrolle verwendet (D).

Ausgehend von dieser Beobachtung, das SU(VAR)3-9 in der Lage ist, Methylgruppen auf Histon H3, speziell an der Modifizierungsposition Lysin 9, zu übertragen, wurden Methyltransferase-Assays auch für die rekombinanten SUVH1 und SUVH2 Proteine durchgeführt. Dabei wurden sowohl Peptide, rekombinante Histone als auch rekombinante rekonstituierte Nukleosomen als Substrat eingesetzt. Das rekombinante SUVH2-Protein methyliert *in vitro* die Histone H3 und H4. Dabei war bei den verwendeten H3-Peptiden 1-20 sowie bei den rekombinanten Histonen H3 und H4 nur eine schwache Aktivität zu beobachten. Wurden rekonstituierte Nukleosomen verwendet, erfolgte eine wesentlich stärkere Methylierung des Substrates, was auf die Abhängigkeit der Methyltransferaseaktivität des SUVH2 Proteins von Nukleosomen hindeutet. Das

als Kontrolle verwendete SU(VAR)3-9 methyliert das als Substrat angebotene rekombinante H3 sowie die synthetisch hergestellten H3-Peptide AS 1-20. Bei den Nukleosomen als Substrat wurde eine schwächere Aktivität festgestellt (Abb. 22). Für SUVH1 wurde keine Methyltransferaseaktivität in den Assays beobachtet .

3.5 Differentielle Effekte von *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH4*-Nullmutanten auf heterochromatische Histon- und DNA-Methylierung

Für einige Mitglieder der SUVH-Gruppe wurde eine Histon-Methyltransferaseaktivität sowohl aufgrund von Strukturhomologien zu bereits bekannten Methyltransferasen als auch durch Identifizierung von *in vitro*-Methylierungsaktivitäten gezeigt. Mit Hilfe von immunocytologischen Analysen wurden die Wirkung von „loss of function“-Mutationen (T-DNA Insertion und Antisense) der Gene *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH4* auf die Modifikation von Histonen sowie auf die DNA-Methylierung untersucht.

Spezifische Methylierungsmarkierungen für Heterochromatin in *Arabidopsis* sind mono- und dimethyl-H3K9 und mono- und dimethyl-H3K27 sowie monomethyl-H4K20. Zusammen mit hohen Konzentrationen von methylierter DNA definieren vor allem diese Methylierungen heterochromatische Bereiche in *Arabidopsis*, während dimethyl-H3K4, acetyl- sowie trimethyl-H3K9, trimethyl-H3K27, mono-, di- und trimethyl-H3K36 sowie di- und trimethyl-H4K20 hauptsächlich euchromatische Bereiche spezifizieren (Abb. 23). Dimethyl-H3K27 stellt dabei einen Grenzfall dar, da es, zumindestens cytologisch, zwar vorwiegend im Heterochromatin vorgefunden wird, aber auch eine schwache Lokalisierung im Euchromatin nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wurde auch phosphoryliertes H3S10 in den heterochromatischen Bereichen der *Arabidopsis*-Interphasekerne nachgewiesen (Abb. 24).

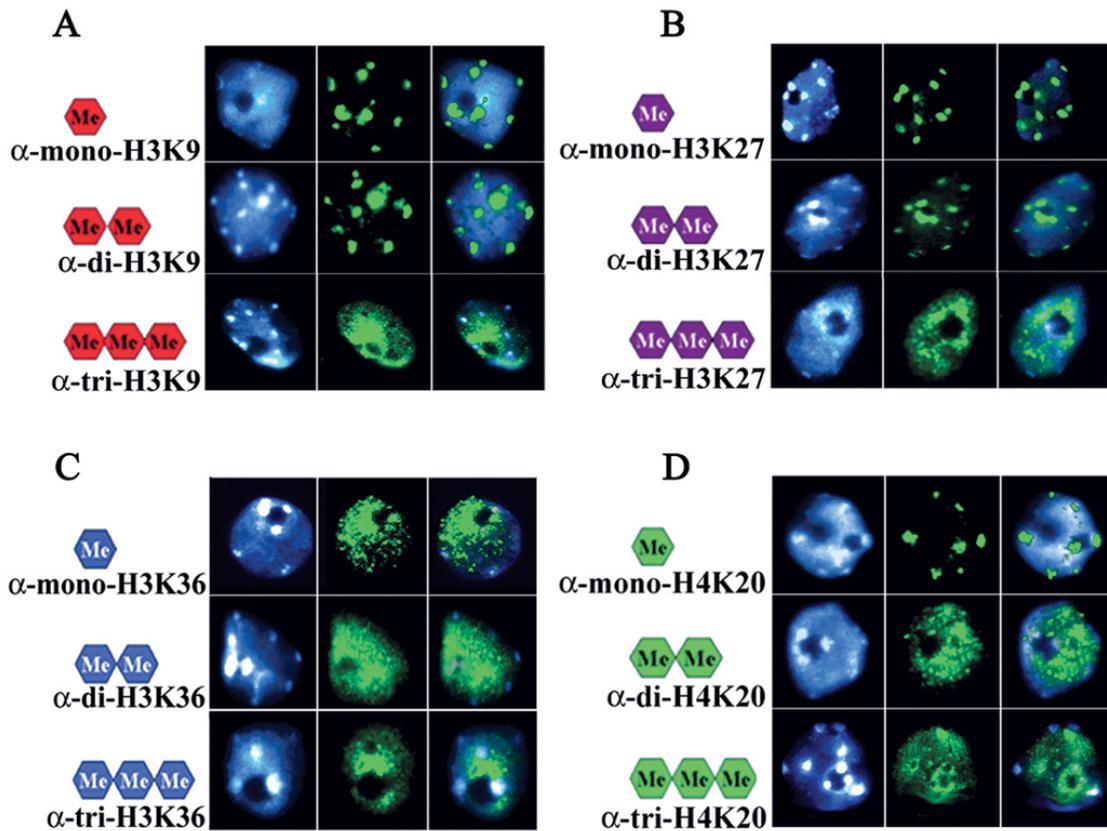


Abb. 23: Histonmethylierungsmarkierungen in *Arabidopsis*-Interphasekernen. Immunocytochemische Analysen der Mono-, Di- und Trimethylierung für die Histonpositionen H3K9 (A), H3K27 (B), H3K36 (C) und H4K20 (D) unter Verwendung spezifischer Antikörper.

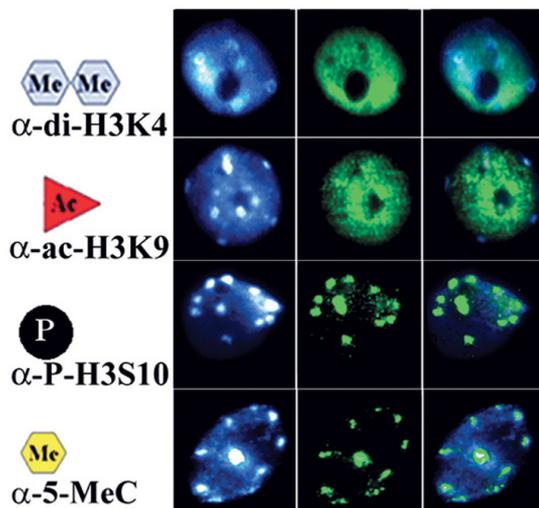


Abb. 24: Eu- und heterochromatische Histon- und DNA-Modifikationen in *Arabidopsis*-Interphasekernen. Immunocytochemische Analysen der Histonmodifikationen dimethyl-H3K4, acetyl-H3K9, phosphoryliertes H3S10 sowie der 5-Methylcytosinmethylierung unter Verwendung spezifischer Antikörper.

Mit spezifischen Antikörpern gegen diese Histon-Methylierungsmarkierungen wurden Veränderungen in den einzelnen *suvh*-Mutanten und Überexpressionslinien sowohl immunocytoologisch nachgewiesen, als auch immunohistochemisch im Westernblot quantifiziert. Diese Mutanten wurden zuvor molekular charakterisiert, um zum einen eine Beeinflussung anderer *SUVH*-Gene dieser konservierten Genfamilie durch Insertionen der Transgene auszuschließen, zum anderen wurde die korrekte Position der T-DNA Insertion im endogenen Gen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass es zu keiner Beeinflussung anderer *SUVH*-Gene in den Antisense- bzw. T-DNA Insertionslinien von *SUVH1* und *SUVH2* kommt (Naumann et al., 2005). In den immunocytoologischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass T-DNA-Insertionsmutationen für das *SUVH1*-Gen (SALK003675) nur einen geringen Einfluss auf die Modifizierung der heterochromatischen Histon- und DNA-Methylierung hat (Abb. 25).

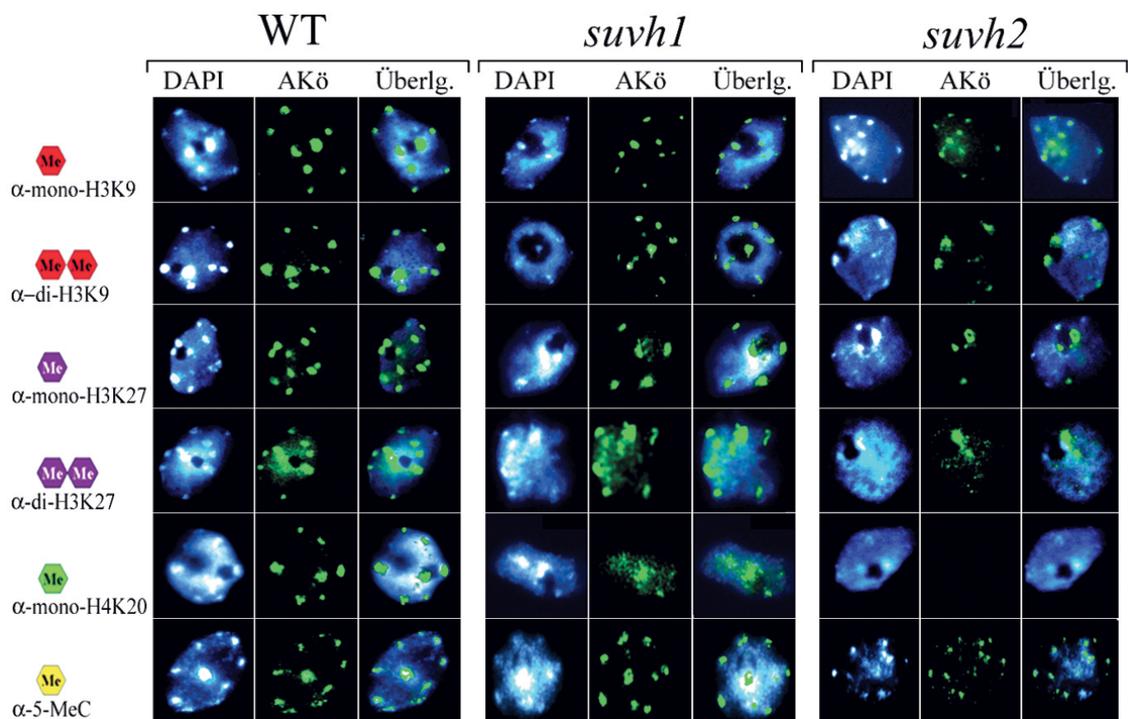


Abb. 25: Analyse der Histon- und DNA-Methylierung in *SUVH1* und *SUVH2* T-DNA Linien.

Nach immunocytoologischer Färbung mit spezifischen Antikörpern wurde in der *SUVH1* T-DNA Linie (SALK003675) im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Änderung der Histon- und DNA-Methylierungen beobachtet. In Interphasekernen der *SUVH2* T-DNA Linie (SALK 079574) sind die heterochromatischen Methylierungsmarkierungen reduziert.

Auch in den quantifizierenden Westernanalysen wurden keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen (Abb. 27). In den untersuchten *SUVH4* T-DNA Insertionslinien (SALK130630, SALK105816) sowie der *kyp-2* Mutante wurden ebenfalls kaum signifikante Veränderungen sowohl in den heterochromatischen als auch in den

euchromatischen Histonmethylierungsmarkierungen, sowie bei der 5-Methylcytosinmarkierung gefunden (Abb. 28). Die deutlichsten Veränderungen wurden in *SUVH2* Linien beobachtet. Hierbei zeigte die T-DNA Insertionslinie von *SUVH2* (SALK079574) eine deutliche Reduzierung in den heterochromatischen Methylierungsmarkierungen (Abb. 25). Dabei korrelieren die immunocytoologisch sichtbaren Veränderung der Antikörperfärbungen mit den im Westernblot quantifizierten Befunden. Insbesondere dimethyliertes H3K9, monomethyliertes H3K27 sowie monomethyliertes H4K20 waren sowohl cytologisch und auch im Westernblot reduziert (Abb. 25 und 27). Die Reduktion der heterochromatischen Histonmethylierungsmarkierungen korrelierte mit einer signifikanten Verkleinerung der Chromozentren in den *SUVH2* T-DNA Insertionslinien. Eine immunocytoologisch erkennbare Reduzierung der DNA-Methylierung in diesen Linien konnte zwar nicht quantifiziert werden, wurde aber in weiteren Bisulfit-Sequenzierungsexperimenten an verschiedenen Transgenen, wie *LUC7* und *GUS27* sowie am Athila-Transposon nachgewiesen (Abb. 31 und 32). Vergleicht man den Effekt der T-DNA Linien von *SUVH1* und *SUVH2* auf euchromatische Histonmarkierungen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, so sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Wildtypkernen feststellbar (Abb. 26).

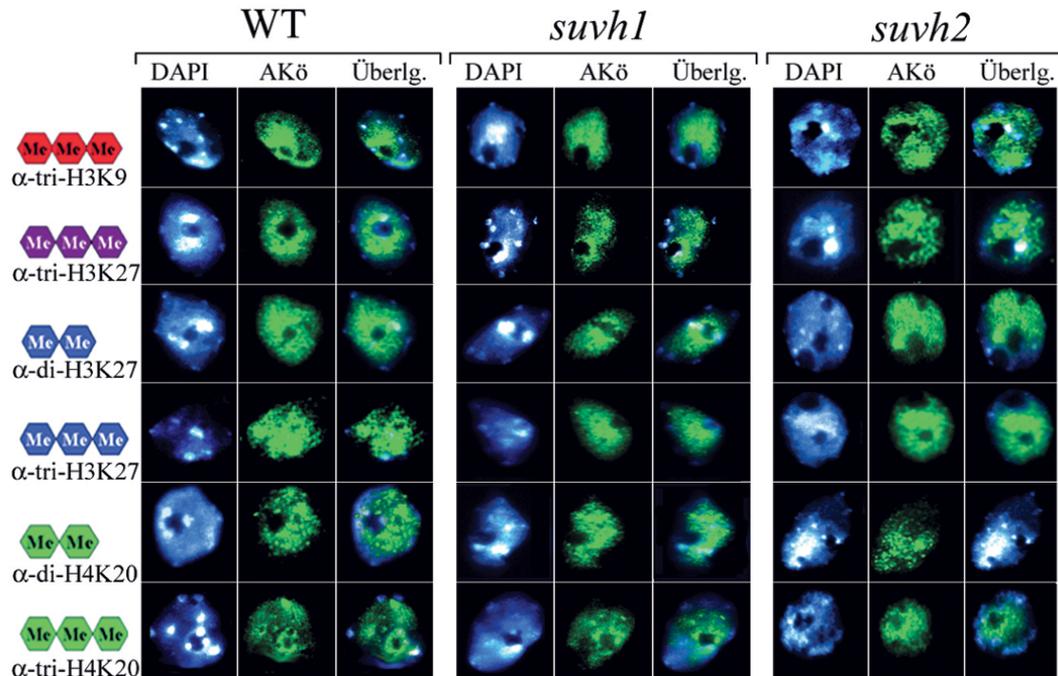


Abb. 26: Analyse der euchromatischen Histonmarkierungen in *suvh1* und *suvh2*.

Weder in der *SUVH1*- noch in der *SUVH2*-T-DNA Insertionslinie wurden signifikante Änderungen der euchromatischen Methylierungsmarkierungen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Gefärbt wurden Interphasekerne von Wildtyp, *suvh1* und *suvh2* mit spezifischen Antikörpern gegen Histonmodifizierungen.

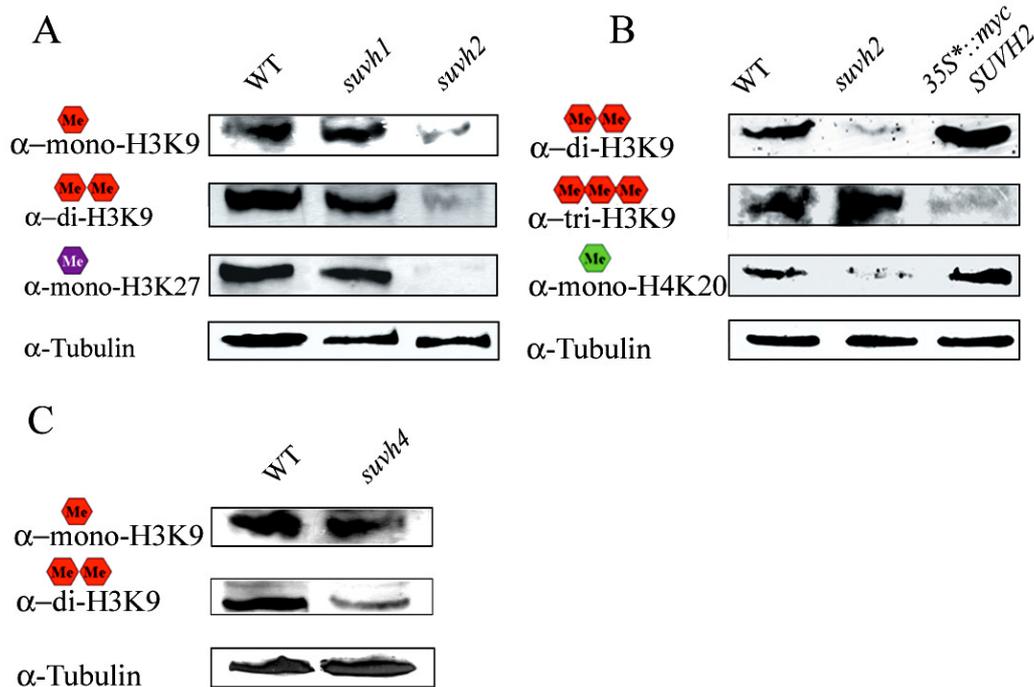


Abb. 27: Westernblot-Analysen von *suvh1*, *suvh2* und *suvh4* sowie *SUVH2*-Überexpressionslinien. Während in der *SUVH1* T-DNA Insertionslinie keine signifikanten Unterschiede in der Histonmethylierung gefunden wurden, konnte in der *SUVH2* T-DNA Insertionslinie eine Reduktion von mono- und dimethyl-H3K9 sowie dimethyl-H3K27 beobachtet werden (A). Die Überexpression von *SUVH2* führt zu einer Erhöhung von dimethyl-H3K9 sowie monomethyl-H4K20 (B). In der *SUVH4* T-DNA Insertionslinie (SALK 130630) ist dimethyl-H3K9 reduziert (C).

SUVH4 oder KRYPTONITE wurde als weiteres *SUVH*-Protein analysiert. Dabei sollten bereits durchgeführte immunocytoologische Analysen (Jasencakova et al., 2003; Jackson et al., 2004) dieser bereits gut charakterisierten Histon H3 Lysin 9 Methyltransferase bestätigt werden, und als vergleichende Kontrolle zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *SUVH*-Gene dienen. Für die cytologischen Arbeiten wurden die *SUVH4* T-DNA Insertionslinien SALK105816 und SALK 130630 sowie die *kyp-2* Mutante (Jackson et al., 1999) untersucht. Die in der *kyp-2* Mutante bereits festgestellte drastische Umverteilung der dimethyl-H3K9 Methylierung aus den Chromozentren in euchromatische Bereiche (Jackson et al., 2004) konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich eine zum Wildtyp kaum veränderte Färbung, sowohl für dimethyl-H3K9 als auch in allen anderen heterochromatischen Markierungen (Abb. 28). In den Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen mono- und dimethyliertes H3K9 wurde eine Reduktion von dimethyl-H3K9 bei der *SUVH4*-T-DNA Insertionslinie (SALK 105816) gefunden (Abb. 27). Alle verwendeten *suvh4*-Mutantenallele wurden als solche auch molekular mit Hilfe von PCR und semiquantitativer RT-PCR charakterisiert, um sowohl die Lage der T-DNA Insertionen im endogenen Gen als auch die Expression zu verifizieren (K. Naumann, persönliche Mitteilung).

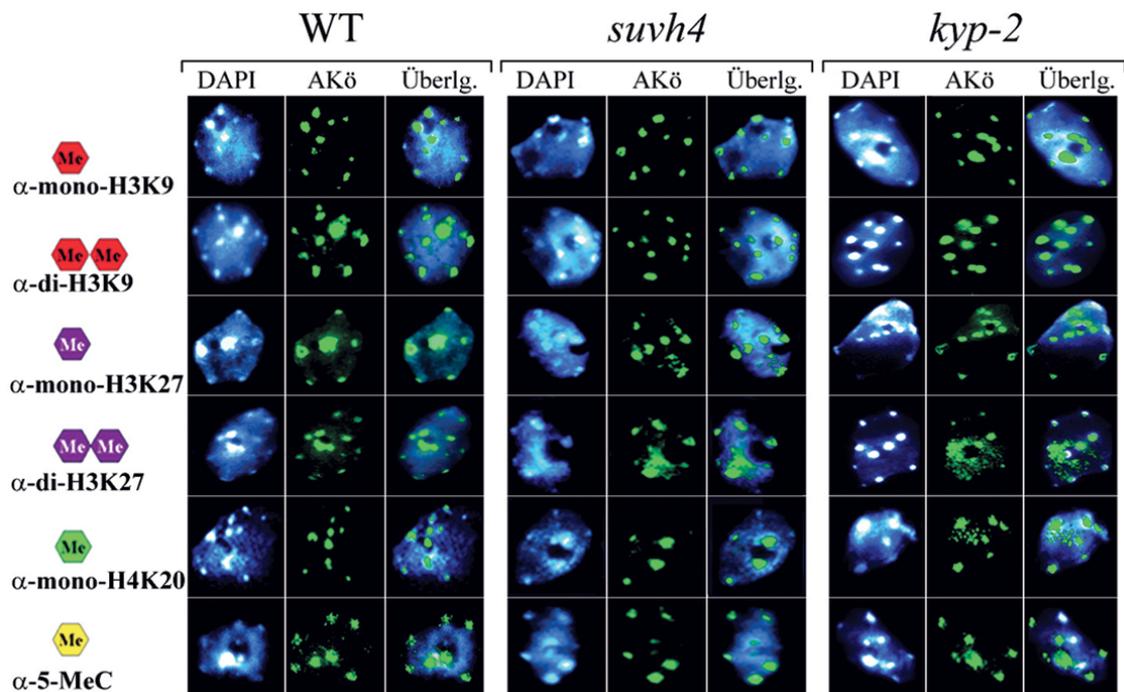


Abb. 28: Histon- und DNA-Methylierung in der *SUVH4* T-DNA Linie sowie der *kyp-2* Mutation. Sowohl die *SUVH4* T-DNA Insertionslinie (SALK 105816) als auch die *kyp-2* Mutation haben keinen signifikanten Effekt auf die immunocytologisch nachweisbaren Chromatinmodifizierungen. Untersucht wurden heterochromatische Markierungen mit den jeweiligen angegebenen Antikörpern.

3.6 Ektopische Heterochromatisierung durch *SUVH2*-Überexpression

Für die Analyse der Modifizierung von DNA und Histonen wurde der Effekt der Überexpressionen von *SUVH1* und *SUVH2* in *Arabidopsis* untersucht. Dazu wurden transgene Linien von *SUVH1* und *SUVH2* hergestellt. Diese wurden unter Kontrolle des konstitutiven *CaMV 35S**-Promoters bzw. des Dexamethason-induzierbaren *GVG*-Promoters in der Pflanze exprimiert.

Die Überexpression von *SUVH1* führt zu keiner signifikanten cytologisch sichtbaren Veränderung von Histon- und DNA-Modifikationen. Das transgen exprimierte *SUVH1* bleibt auch nach der Überexpression in den heterochromatischen Bereichen lokalisiert (Abb. 18). Auch eine starke Überexpression von *SUVH1* unter induzierten Bedingungen zeigte keine signifikante Änderung der Histon- und DNA-Methylierung.

Die Überexpression von *SUVH2* führt bereits unter Kontrolle des reduziert exprimierenden *35S**-Promoters zu einer ektopischen Verteilung der heterochromatischen Histon- und DNA-Modifikationen mono- und dimethyl-H3K9, mono- und dimethyl-

H3K27, monomethyl-H4K20 und 5-Methylcytosin. Dabei bindet das überexprimierte *SUVH2* offensichtlich auch verstärkt an Positionen außerhalb der Chromozentren, wo es dann auch als transgenes Fusionsprotein nach Antikörperfärbung gegen den Fusionsanteil nachgewiesen wird (Abb. 21). Die Funktion als regulatorische Komponente für Histon- und DNA-Methylierung übt das transgen exprimierte *SUVH2* dann offensichtlich auch an diesen euchromatischen Positionen aus. Diese zusätzlichen Methylierungsstellen konnten dann unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper für heterochromatische Histon- und DNA-Methylierung immunocytoologisch nachgewiesen werden (Abb. 29). Analysen im Westernblot mit Antikörpern für di- und trimethyl-H3K9 sowie monomethyl-H4K20 wurden zur Quantifizierung dieser immunocytoologischen Beobachtungen herangezogen. Dabei konnte eine Erhöhung von dimethyl-H3K9 sowie eine leichte Verstärkung von monomethyl-H4K20 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 27).

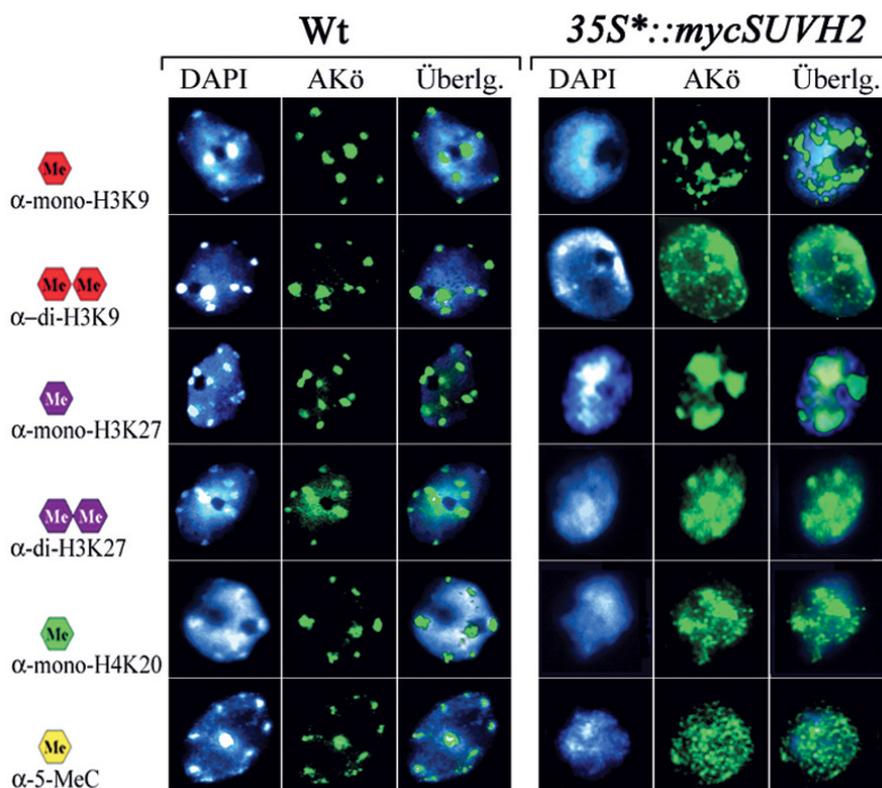


Abb. 29: Histon- und DNA-Modifizierung nach *SUVH2*-Überexpression.

In *35S*::mycSUVH2*-Linien wird eine ektopische Verteilung heterochromatischer Markierungen für Histone und DNA in den Interphasekernen vorgefunden. Immunocytoologische Analysen mit den angegebenen spezifischen Antikörpern.

Nach Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen dimethyl-H3K9 konnte für die Linien *35S*::mycSUVH2#4*, *35S*::mycSUVH2#5*, *35S*::mycSUVH2#6* und *35S*::mycSUVH2#22* auch eine Korrelation zwischen der erhöhten Expression des *SUVH2*-

Transgens (Abb. 20) und einer Verstärkung der H3K9-Dimethylierung gezeigt werden. Dabei ist bereits in der moderat das *SUVH2*-Transgen exprimierenden Linie *35S*::mycSUVH2#4* eine gesteigerte Methylierung im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb. 30).

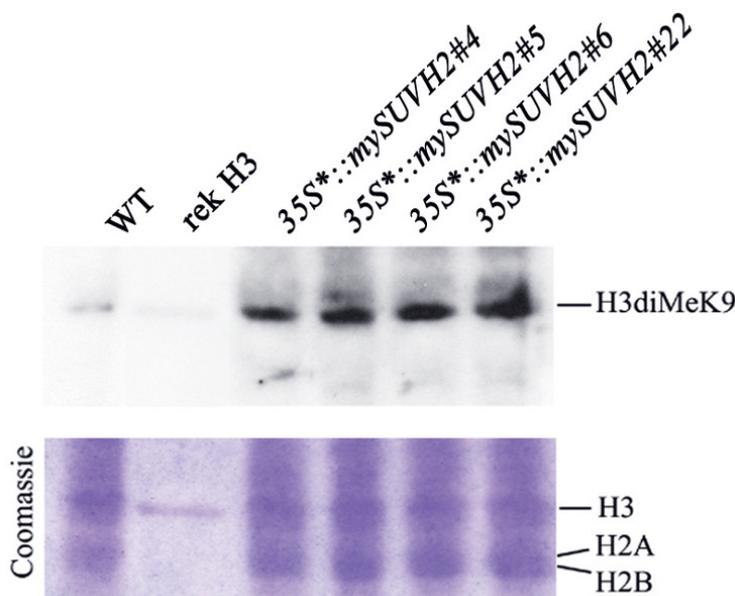


Abb. 30: Westernblot-Analysen von dimethyl-H3K9 in *SUVH2*-Überexpressionslinien.

In Histonextraktionen aus *SUVH2*-Überexpressionslinien sind erhöhte dimethyl-H3K9 Signale im Vergleich zum Wildtyp detektierbar. Als Quantifizierung wurde das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel verwendet. Rekombinantes H3 diente als Kontrolle für unspezifische Bindung des Antikörpers.

Die euchromatischen Methylierungsmarkierungen in *Arabidopsis*, dimethyl-H3K4, acetyl- und trimethyl-H3K9, trimethyl-H3K27 und dimethyl- sowie trimethyl-H4K20 wurden ebenfalls untersucht. Hierbei wurden spezifische Antikörper gegen diese Histonmodifizierungen für Histon H3 und Histon H4 verwendet. Bei einigen dieser Modifizierungen konnte eine deutliche, immunocytoologisch sichtbare Verringerung der Antikörperfärbung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. So sind trimethyl-H3K9 und trimethyl-H3K27 sowie dimethyl-H3K9 und acetyl-H3K9 reduziert (Abb. 31). Diese Reduktion von trimethyl-H3K9 nach *SUVH2*-Überexpression konnte auch im Westernblot quantifiziert werden (Abb. 27).

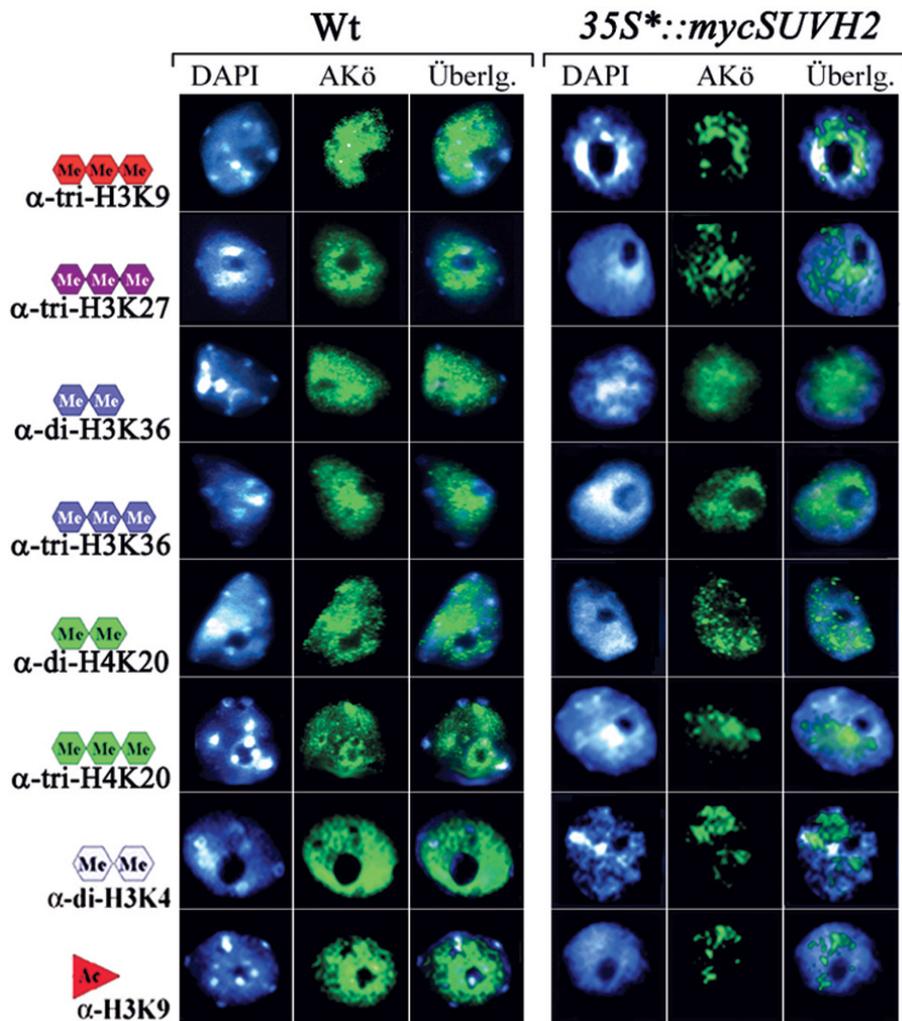


Abb. 31: Die Euchromatin-spezifischen Histonmethylierungen werden durch *SUVH2*-Überexpression reduziert. Immunocytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern zeigen eine Reduzierung der euchromatischen Histonmarkierungen in *35S*::mycSUVH2*-Linien im Vergleich zum Wildtyp.

Die immunocytologisch beobachtete ektopische Heterochromatisierung in *SUVH2*-Überexpressionslinien wurde auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten gefunden (Kooperation mit G. Hause, Halle). Dabei wurde festgestellt, dass in Zellkernen von transgenen *SUVH2*-Linien ca. 70% mehr heterochromatische Bereiche auftraten als in der Wildtypkontrolle. Außerdem wurde eine Verkleinerung der Nukleoli in den *SUVH2*-Überexpressionslinien beobachtet (Abb. 32).

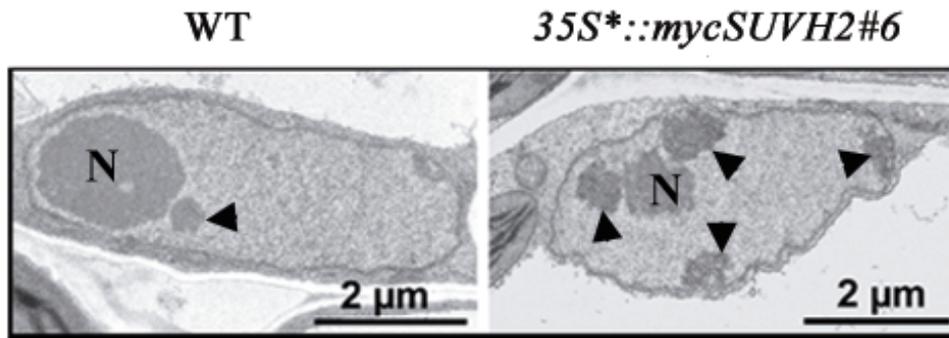


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Analysen von Zellkernen aus *35S*::mycSUVH2* Linien und dem Wildtyp. Aufnahmen von Ultradünnschnitten der Zellkerne. Die heterochromatischen Bereiche (Pfeile) sind in Kernen der *SUVH2*-Überexpressionslinien verstärkt zu beobachten. (Aufnahmen von G. Hause, Halle).

3.7 Differentielle Modifizierung der DNA-Methylierung durch Nullmutation und Überexpression von *SUVH2*

In den immunocytologischen Untersuchungen der *SUVH2*-Überexpressionslinien sowie der *SUVH2*-Mutantenallele wurde auch eine signifikante Veränderung im Ausmaß der DNA-Methylierung beobachtet. DNA-Methylierung ist in *Arabidopsis* zum großen Teil mit Gen-Silencing verbunden. Um den dosisabhängigen Effekt von *SUVH2* auf transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) zu untersuchen, wurden mehrere Testsysteme genutzt. Das *GUS*-TGS System besteht aus einer transgenen Linie mit 3 Tandemkopien des *GLUCURONIDASE*-Gens (*GUS*), welches in der verwendeten Linie moderat inaktiviert wird.

Nach Einkreuzung der hemizygoten *SUVH2*-Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#6/+* in die hemizygoten Linie *35S*::GUS27/+* erfolgte eine Verstärkung des Silencing des *GUS*-Gens. Dieser dosisabhängige Effekt wird auch auf das Silencing eines anderen Markergens, *LUCIFERASE* (*LUC*), beobachtet. Dazu wurde die *SUVH2*-Überexpressionslinie in eine transgene *LUCIFERASE*-Linie eingekreuzt, in welcher zuvor ein partielles Silencing des *LUCIFERASE*-Gens beobachtet wurde (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Nach der Kreuzung der *SUVH2* Linie *35S*::mycSUVH2#4* mit der *35SS*::LUC2* Linie wurde eine verstärkte Inaktivierung des *LUCIFERASE*-Gens beobachtet. Insofern reichten schon geringe Proteinmengen des transgen exprimierten *SUVH2*-Gens, wie sie in der Linie *35S*::mycSUVH2#4* vorgefunden werden, für ein effizientes Silencing des *LUCIFERASE*-Markergens aus. Wird die Kreuzung in die

GUS27- und *LUC2*-Linien mit der *SUVH2* Antisense-Linie *35S::SUVH2as#11* durchgeführt, so kommt es zu einer kompletten Aufhebung des TGS sowohl von *GUS* als auch von *LUC* (K. Naumann, pers. Mitteilung). Zur Analyse der Korrelation zwischen den beobachteten Silencing-Effekte und einer Veränderung der DNA-Methylierung wurden Southernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden sowohl *35S*-SUVH2*- und Antisense-*SUVH2* Pflanzen sowie die T-DNA Insertionslinie von *SUVH2* unter Verwendung einer 180 bp Repeat- als auch einer *Luciferase*-Sonde untersucht, aber nur geringfügige Veränderungen in der symmetrischen DNA-Methylierung gefunden (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Aufgrund dieser Ergebnisse für die symmetrischen DNA-Methylierungsmotive lag die Vermutung nahe, dass die Veränderung der DNA-Methylierung sich hauptsächlich auf die nicht-symmetrische Methylierung mit dem Motiv CpNpN (N=A, C, T) bezieht, welche mit den normal für die Analyse verwendeten methylierungssensitiven Restriktionsenzymen kaum feststellbar ist. Zur Untersuchung solcher Methylierungsmuster an einzelnen Cytosinpositionen wurden am Transgenrepeat des *LUCIFERASE*-Gens (Naumann et al., 2005), des *GLUCURONIDASE*-Gens (Abb. 33) sowie des Athila-Transposons (Abb. 34) Bisulfid-Sequenzierungen durchgeführt. Dazu wurden Veränderungen der DNA-Methylierung in Überexpressions-, Antisense- und T-DNA-Insertionslinien von *SUVH2* mit dem Wildtyp verglichen.

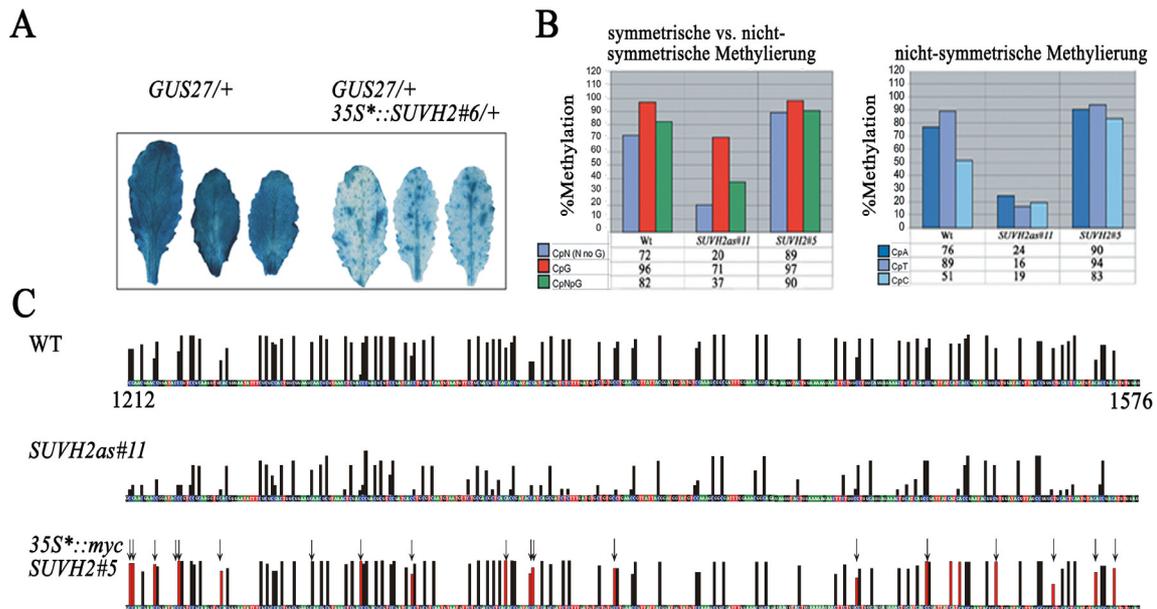


Abb. 33: Dosisabhängiger Effekt von *SUVH2* auf die DNA-Methylierung

Nach der Kreuzung der Linie *35S::GUS27/+* mit der *35S*::SUVH2#6/+* Überexpressionslinie erfolgte ein Silencing des *GUS*-Transgenrepeats (A). Vorrangig die nicht-symmetrische Methylierung ist dosisabhängig von *SUVH2* beeinflusst, das Motiv CpC reagiert besonders (B). In der Antisense-Linie *35S::SUVH2as#11* ist eine Hypomethylierung, in der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#5* eine Hypermethylierung der DNA an bestimmten Cytosinpositionen (Pfeile) im Vergleich zur *GUS*-Kontrolle zu beobachten. Gezeigt ist die über Bisulfid-Sequenzierung analysierte Region des *GUS*-Gens (C).

In den untersuchten *SUVH2*-Überexpressionslinien *35S*::mycSUVH2#6* und *35S*::mycSUVH2#5* ist die DNA-Methylierung in den untersuchten Sequenzmotiven vor allem in den nicht-symmetrischen aber auch, im geringeren Maße, in den symmetrischen Motiven verstärkt. Dabei ist hauptsächlich die nicht-symmetrische DNA-Methylierung betroffen. Das Motiv CpC reagiert hier am stärksten. In den analysierten Antisense und T-DNA Insertionslinien von *SUVH2* ist die DNA-Methylierung in allen Sequenzmotiven signifikant reduziert. Hierbei ist nicht-symmetrische Methylierung am stärksten beeinflusst, hauptsächlich das Motiv CpC (Abb. 33 und 34).

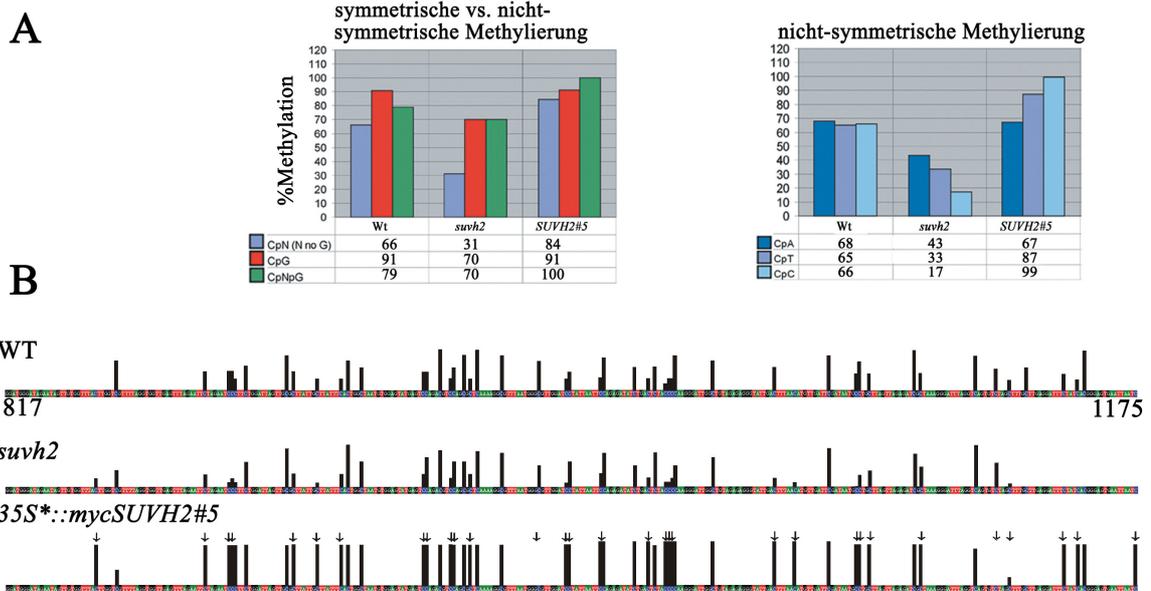


Abb. 34: Modifikation der DNA-Methylierung des Athila-Transposons durch SUVH2.

Hauptsächlich die nicht-symmetrische DNA-Methylierung im Athila-Transposon wird in *SUVH2*-Überexpressionslinien verstärkt, in *suvh2* reprimiert. Das Motiv CpC ist besonders beeinflusst (A). Vorrangig nicht-symmetrische Sequenzmotive sind in der *SUVH2* T-DNA Insertionslinie hypomethyliert, in der *SUVH2*-Überexpressionslinie hypermethyliert (Pfeile). Übersicht über die durch Bisulfid-Sequenzierung untersuchte Region von Athila (B).

Veränderungen der DNA-Methylierung werden nicht nur innerhalb derselben Generation etabliert, sondern auch in die nächsten Generationen epigenetisch stabil, wahrscheinlich durch Imprinting-Mechanismen, vererbt. Diese Effekte wurde auch für die dosisabhängige Änderung der DNA-Methylierungen in den *SUVH2*-Linien untersucht. Dazu wurde der aus der F1 Generation resultierende Genotyp *LUC2/+* der Kreuzung der *SUVH2*-Überexpressionslinie *35S*:: mit der *LUCIFERASE*-Linie *35S::LUC2/+* mit Wildtyp rückgekreuzt. Nach Analyse der *LUCIFERASE*-Aktivität in dieser Rückkreuzung wurde beobachtet, daß das *LUCIFERASE*-Gen weiterhin inaktiviert ist. Die Änderung der DNA-Methylierung bleibt auch in den resultierenden Nachkommen der *SUVH2*-Kreuzung ohne Anwesenheit des *SUVH2*-Transgens zumindest partiell epigenetisch stabil. Dabei wurde eine DNA-Hypomethylierung des *LUCIFERASE*-Gens in den Nachkommen der *SUVH2*-Überexpression als Ausgangslinie bzw. eine starke Supprimierung der DNA-Methylierung von *LUCIFERASE* in Linien mit dem Antisense von *SUVH2* als Eltern beobachtet (Naumann et al., 2005). Diese Daten deuten darauf hin, daß die von *SUVH2* induzierten epigenetischen Effekte auf das Silencing des Transgens unmittelbar mit einer Veränderung der DNA-Methylierung verbunden sind.*

Zur Identifizierung der genetischen Interaktion von *SUVH2* wurden Kreuzungsanalysen mit Mutanten der bereits gut charakterisierten Modifikatoren für DNA-Methylierung MET1 (Finnegan und Kovac, 2000), CMT3 (Bartee und Bender, 2001; Kankel et al., 2003) sowie DDM1 (Jeddeloh et al., 1999; Mittelsten Scheid et al., 2002) durchgeführt. Dazu wurden von der DNA-Methyltransferase MET1 das neu isolierte Mutantenallel *met1-h1* und von der DNA-Methyltransferase CMT3 das neu isolierte Mutantenallel *cmt3-h1* genutzt (Hofmann, 2004). Für den Chromatin-Remodeling Faktor DDM1 wurde das Allel *ddm1-2* verwendet (Jeddeloh et al., 1999; Mittelsten Scheid et al., 2002). Für die Analyse der dosisabhängigen Veränderung von Gensilencing wurden *LUC7/LUC7; met1-h1/met1-h1*, *LUC7/LUC7; cmt3-h1/cmt3-h1* sowie *ddm1-2/ddm1-2* Pflanzen mit der Linie *35S*S::mycSUVH2#5* gekreuzt. In den Experimenten mit dem *LUCIFERASE*-Markergen wurde die *LUCIFERASE*-Aktivität gemessen (Hofman, 2004), in den Kreuzungen mit dem *ddm1-2* Allel wurden phänotypische Effekte analysiert (K. Naumann, pers. Mitteilung), sowie immunocytologische Untersuchungen durchgeführt (Abb. 35). In *LUC7/LUC7; met1-h1/met1-h1; SUVH2/+* dominiert der Suppressoreffekt des *met1-h1* Allels über den Enhancereffekt der *SUVH2*-Überexpression auf die *LUCIFERASE*-Expression. Dies wurde sowohl in hemizygoten *SUVH2* als auch in homozygoten *SUVH2*-Nachkommen analysiert. In *LUC7/LUC7; cmt3-h1/cmt3-h1; SUVH2/+* dominiert der Enhancereffekt der *SUVH2*-Überexpression über den Silencing-Suppressoreffekt des *cmt3-h1* Allels. Hier wurde eine Verstärkung des Enhancereffektes in *SUVH2* homozygoten Linien sowie auch der typische *SUVH2* „mini-plant“-Überexpressionsphänotyp beobachtet. Betrachtet man die Interaktion zwischen dem *ddm1-2* Allel und der *SUVH2*-Überexpression in *ddm1-2/SUVH2* Kreuzungen, so fällt eine Reversion des *SUVH2* „mini-plant“-Phänotyps zu Wildtypwuchs auf und *ddm1-2/ddm1-2; SUVH2/+* Pflanzen zeigen einen Wildtyp-Phänotyp (Abb. 35).

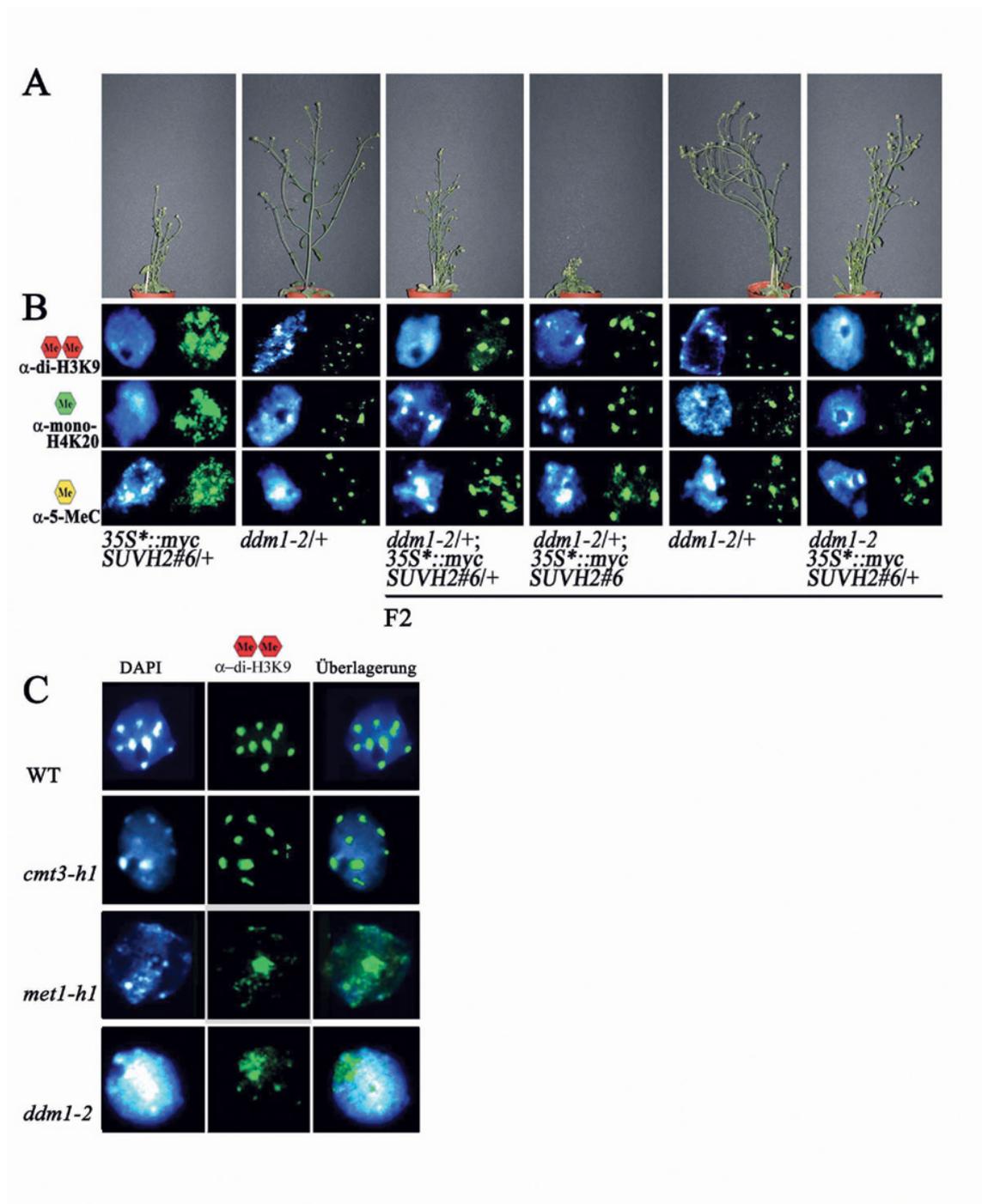


Abb. 35: Interaktion zwischen SUVH2 und DDM1 und Dimethylierung von H3K9 in DNA-Methyltransferasemutanten.

Der SUVH2 „mini-plant“-Phänotyp wird nach Kreuzung mit dem *ddm1-2* Allel supprimiert (A). Die ektopische Verteilung von dimethylierten H3K9, monomethylierten H4K20 sowie 5-Methylcytosin in Interphasekernen der Überexpressionslinie *35S*::mycSUVH2#6* wird nach der Kreuzung mit dem *ddm1-2* Allel reduziert (B). In den *DDM1*- sowie *MET1* Allelen *ddm1-2* und *met1-h1* ist die H3K9 Dimethylierung im Vergleich zum Wildtyp reduziert, nicht aber in dem *CMT3* Mutantenallel *cmt3-h1*(C).

Immunocytoologisch wurde bei den *ddm1-2* sowie dem *met1-h1* Mutantenallel eine sichtbare Reduktion der H3K9-Dimethylierung gefunden. In Linien mit dem *cmt3-h1* *Allel* wurde keine Reduktion dieser Histonmethylierung beobachtet (Abb. 35C).

Nach Einkreuzen der *SUVH2*-Überexpressionslinien mit dem *ddm1-2* Allel wurden in den immunocytoologischen Analysen der Dimethylierung von H3K9, der Monomethylierung von H4K20 und der 5-Methylcytosinmethylierung eine Suppression der ursprünglich ektopischen Verteilung dieser Methylierungen in *SUVH2*- Ausgangslinien beobachtet (Abb. 35). Die Enhancerfunktion von *SUVH2* auf Transkriptionelles Gen-Silencing wird demzufolge in Zusammenarbeit mit *MET1* sowie *DDM1* ausgeübt, ist jedoch unabhängig von der *CMT3* Aktivität.

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung und funktionelle Analyse neuer SET-Domänengene von *Arabidopsis thaliana*, wobei zunächst die Gene *SUVH1* und *SUVH2* im Mittelpunkt der Arbeiten standen. Zuerst wurden *in vivo*-Studien an den pflanzlichen Modellsystemen *Allium cepa* sowie *Scilla mischtschenkoana* zur Analyse der Lokalisierung und Verteilung der SUVH1- und SUVH2-Fusionsproteine vorgenommen. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Gene und ihrer Proteine sowie Untersuchungen ihrer organspezifischen Expression in *Arabidopsis thaliana*. Dazu erfolgte die Klonierung der Gene *SUVH1* und *SUVH2* in die verschiedenen Vektoren für die funktionellen Analysen. Weiterhin wurden *in vivo*-Untersuchungen an *Arabidopsis*-Linien durchgeführt, welche stabil *SUVH1* und *SUVH2* konstitutiv und auch induzierbar als Transgen exprimierten. Zur Analyse der Funktion dieser Gene bei der Kontrolle von Histonmethylierungen wurden auch umfangreiche immunocytologische Studien durchgeführt. Durch enzymatische Analysen mit SUVH2 konnte eine Reihe von neuen Ergebnissen zur HMTase-Funktion dieses Proteins in *Arabidopsis* gewonnen werden.

4.1 *Su(var)3-9* homologen Gene von *Arabidopsis thaliana*

SU(VAR)3-9 wurde als dosisabhängiger Suppressor für Positionseffekt-Variation in *Drosophila* isoliert (Tschiersch et al., 1994). Das SU(VAR)3-9 Protein kontrolliert heterochromatin-abhängiges Gen-Silencing durch die Methylierung von H3K9 im Heterochromatin des Chromozentrums. Dabei erfolgt eine direkte Interaktion von SU(VAR)3-9 mit HP1 und die Bindung dieses Komplexes an das zuvor durch SU(VAR)3-9 methylierte H3K9. Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung von heterochromatischen Strukturen und die Kontrolle von Gen-Silencing.

In den letzten Jahren wurde in *Arabidopsis* eine Reihe von SET-Domänengenen identifiziert. Nachdem zuerst Analysen der *Enhancer of zeste E(z)* Homologen in *Arabidopsis*, *CURLY LEAF (CLF)* und *MEDEA (MEA)*, Goodrich et al., 1997; Grossniklaus et al., 1998) anhand von Entwicklungsmutanten dieser Gene durchgeführt wurden, begann später eine systematische Gruppierung und funktionelle Analyse aller SET-Domänengene aus *Arabidopsis* (Baumbusch et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir uns

auf die Analyse der Gruppe der zu *Drosophila Su(var)3-9* homologen Gene *SUVH* von *Arabidopsis thaliana* konzentriert. Hierbei wurden für die weiteren Untersuchungen die Gene *SUVH1* und *SUVH2*, teilweise auch *SUVH3* und *SUVH4* ausgewählt. *SUVH1* und *SUVH3* gehören zur *SUVH1*-Subgruppe, während *SUVH2* der *SUVH2*-Subgruppe und *SUVH4* der *SUVH4*-Subgruppe der *SUVH*-Gene in *Arabidopsis* zugeordnet werden. Die Unterteilung der *AtSUVH*-Gene erfolgte zum einen aufgrund von Sequenzunterschieden in der SET-Domäne. Hier wurde eine unterschiedliche Anzahl der C-terminal gelegenen konservierten Cysteinen gefunden. Aber auch die Aminosäurereste in der katalytischen Domäne unterscheiden sich in den einzelnen *SUVH*-Genen. Die Gruppierung der *SUVH*-Gene gibt auch Hinweise auf eine gemeinsame Funktion der Mitglieder einer Gruppe sowie differentielle Aspekte von organspezifischer Expression und Funktion der unterschiedlichen Gruppen. Diese unterschiedliche Funktion der *SUVH*-Gene ist wahrscheinlich im Laufe der Evolution nach und nach spezialisiert worden. So hat sich in niederen Pflanzen, wie den Bryophyten und Pteridophyten, noch keine *SUVH*-Genfamilie diversifiziert. Diese wird erst bei den Angio- und Gymnospermen gefunden (V.Krauss, pers. Mitteilung). Die Genfamilien der *SUVH*- und *SUVR*-Gene haben sich wahrscheinlich durch Retrotransposition und Duplikation von Genombereichen aus einigen wenigen ursprünglichen Genen entwickelt, ein Prozess, der in Pflanzen häufig beobachtet wird (Clegg et al., 1997; Lynch und Conery, 1997). In der *SUVH*-Gruppe ist *SUVH4* das einzige Gen mit einer Reihe von Intronen in der kodierenden Region (Baumbusch et al., 2001). Dieses Gen könnte durch Retrotranspositionen in das ursprüngliche *SUVH4*-Transkript und späterer Insertion oder Etablierung eines Promoters vor dieses Transkript entstanden sein. Dieser Vorgang stellt wahrscheinlich auch den Ausgangspunkt für die Entstehung anderer neuer *SUVH*-Gene dar. Die in *SUVH2* und *SUVH3* befindlichen Intronen in der nichtkodierenden genomischen Region (5'-UTR) könnten ebenfalls durch spätere Insertion von Intronsequenzen in diese Gene entstanden sein.

4.2 Organspezifische Expression und Funktion der *SUVH*-Gene in *Arabidopsis thaliana*

Nachdem 37 SET-Domänengene in *Arabidopsis* über verschiedene Methoden, wie z. B. der PCR mit degenerierten Primern, 5'- und 3'-RACE-Analysen oder über Datenbankvergleiche (BLASTP) identifiziert, und die Expression von 29 dieser Gene gezeigt

wurde (Baumbusch et al., 2001), stellt sich die Frage nach der Funktion einer im Vergleich zu anderen Organismen hohen Zahl von SET-Domänenproteinen in *Arabidopsis*. Eine Erklärung bietet sich in der organspezifischen Expression und der damit verbundene räumlichen bzw. zeitlich begrenzten Funktion von SET-Domänenproteinen. Eine organ- und entwicklungspezifische Expression ist schon für eine Reihe von anderen SET-Domänenproteinen beschrieben worden. So wird *MEDEA* ausschließlich in Embryos während der frühen Entwicklung exprimiert (Grossniklaus et al., 1998). Für *ATX1* wurde eine Expression in frühen Infloreszenzen gezeigt (Alvarez-Venegas et al., 2001). Mit Hilfe von semiquantitativen RT-PCR Experimenten wurde die Expression von *SUVH1-SUVH5* in Keimlingen, Wurzeln, Blättern, Sprossachsen, Knospen, Blütenorganen sowie grünen Schoten analysiert. Das *SUVH1*-Transkript wurde in allen untersuchten Organen gefunden, *SUVH2* und *SUVH3* in den Blättern und Infloreszenzen. Für *SUVH4* und *SUVH5* wurde eine Expression für alle überirdischen Organe beobachtet. Interessant war hierbei, das *SUVH1* als einziges *SUVH*-Gen in der Wurzel exprimiert wird. Dies korreliert mit anderen beobachteten Effekten von *SUVH1* in der Wurzel, wie der knollige Wurzelphänotyp nach *SUVH1*-Überexpression, sowie die Lokalisierung der *SUVH1* Promoter-*GUS* Fusionen.

Analog dem *Drosophila* SU(VAR)3-9 Protein, einer H3K9-Histonmethyltransferase (Schotta et al., 2002), besitzen offensichtlich auch die Mitglieder der *Arabidopsis* *SUVH*- sowie der *SUVR*-Proteinfamilie eine Enzymaktivität für diese Histonposition. Dies ist bereits an den konservierten Aminosäuren im katalytischen Motiv für die Methyltransferaseaktivität in der SET-Domäne zu erkennen. In den *SUVH*-Proteinen ist jedoch keine vollkommene Homologie zu diesen spezifischen Motiven *FINHSC* und *ELSFYD*, welche für die Bindung der Methylgruppen in SU(VAR)3-9 verantwortlich sind, zu finden. Hier ist unter Umständen eine Substratspezifität für bestimmte Histonvarianten oder für Nukleosomen zu vermuten. Letztendlich wurde auch für die *SUVH*-Proteine *SUVH4*, *SUVH6*, *SUVH2* sowie für *SUVR4* der angegliederten *SUVR* Familie eine H3K9-Aktivität gezeigt (Jackson et al., 2002; Jackson et al., 2004; Naumann et al., 2005; Thorstensen et al., 2005). Dabei besteht auch offensichtlich eine Substratspezifität. So zeigen *in vitro*-Analysen, das durch *SUVH4* und *SUVH6* eine, aber auch zwei Methylgruppen auf H3K9 übertragen werden können (Jackson et al., 2002; Jackson et al., 2004). *SUVR4* benötigt wiederum monomethyliertes Substrat für die Methyltransferase-Aktivität *in vitro* (Thorstensen et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen, das wahrscheinlich ein stufenweiser Reaktionsablauf in der H3K9-Methylierung

besteht. Enzyme wie SUVH2 oder SUVH4 übertragen eine Methylgruppe auf H3K9, während darauf aufbauend z.B. SUVR4 eine weitere Methylgruppe addiert und somit eine H3K9-Dimethylierung vollendet. Eine Dimethylierung von unmodifizierten H3K9 ist jedoch auch möglich. Ähnliche spezifische Reaktionskaskaden für die H3K9-Methylierung sind auch aus *Drosophila* bekannt. Hier methyliert SU(VAR)3-9 im Heterochromatin unmethyliertes H3K9 zu dimethyl-H3K9, die Trimethylierung von dimethylierten H3K9 im Zentromer wird, ebenso wie die Monomethylierung von H3K9, von anderen bisher noch nicht identifizierten HMTasen durchgeführt.

SUVH2 selbst weist ein weites Spektrum in seiner substratspezifischen Aktivität für H3K9 sowie H4K20 auf (Naumann et al., 2005). HMTasen für mehrere verschiedene Histonpositionen sind auch von anderen SET-Domänenproteinen bekannt, wie von dem humanen NSD1 sowie von dem WHSC1 homologen Protein aus *Drosophila*. Beide weisen eine Spezifität für H3 und H4 auf (Rayasam et al., 2003; M. Walter, pers. Mitteilung).

Die Spezifität für die Methylierung der einzelnen Aminosäurereste der Histone H3 und H4 zeigt, dass die epigenetische Histon-Code Hypothese (Stahl und Allis 2000; Jennuwein und Allis 2001) nicht universell ist, sondern sich dieser Code artspezifisch unterscheidet. Die Aktivität mehrerer pflanzlichen HMTasen für H3K9 deutet auch auf die Redundanz dieser Enzyme hin. Die Funktion kann aber auch auf verschiedene Organe bzw. Zielsequenzen spezialisiert sein. Hinweise hierauf sind z.B. die Lokalisierung der H3K9-HMTase SUVR4 im Nucleolus. Dies könnte auf eine spezifische Funktion dieser HMTase beim Silencing von rDNA-Repeats hindeuten (T. Thorstensen, pers. Mitteilung).

4.3 Transiente Expressionssysteme und die Analyse der nukleären Verteilung von SUVH-Proteinen

Zur Untersuchung der Lokalisierung und Verteilung der SUVH-Proteine SUVH1, SUVH2 und SUVH3 wurden im Rahmen dieser Arbeit transiente Assaysysteme etabliert. Für die Analyse der Verteilung pflanzlicher Proteine in den Zellkompartimenten wurde der Beschuss präparierter Epidermiszellen von *Alium cepa* mit an Goldpartikeln gekoppelter DNA gewählt. Alle untersuchten Proteine wurden mit GLUCORONIDASE fusioniert. Diese Fusionsproteine wurden nach dem Bombardement in den Zellkern transportiert und nach der Färbereaktion dort beobachtet. Dies funktionierte für SUVH1

und SUVH2, die beiden als Kontrolle verwendeten *Drosophila*-Proteine HP1 und SU(VAR)3-9 waren ebenfalls im Kern zu beobachten. Im Falle von CURLY LEAF war jedoch eine klare Lokalisierung im Zellkern nicht immer nachweisbar. Dies war vor allem durch die Diffusion der umgesetzten X-Gluc Färbelösung in der Zelle zu erklären. Hier konnten letztendlich nur mehrmals wiederholte Färbungen und festgelegte Inkubationszeiten zu einer Aussage über die Lokalisierung von CLF-*GUS* führen.

Wesentlich genauere Lokalisierungen wurden durch die Verwendung von EGFP (sm GFP327) als Fusionsanteil möglich. Hier konnte ohne Fixierung und Färbung die Fluoreszenz direkt *in vivo* nach der Expression beobachtet werden. Alle putativen Kernproteine wurden als EGFP-Fusion im Zellkern von *Alium cepa* nach dem Beschuss beobachtet. Die Fluoreszenz war außerdem nicht immer uniform verteilt. Bei SUVH1, SUVH2 sowie den *Drosophila*-Proteinen SU(VAR)3-9 und HP1 waren innerhalb des Zellkerns Bereiche zu erkennen, welche eine stärkere GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Dies könnte auf eine Lokalisierung der Proteine im Heterochromatin hindeuten. Solche Lokalisierungen sind jedoch in *Alium cepa* schwierig zu analysieren, da hier eine überwiegend diffuse Verteilung des heterochromatischen Materials im Zellkern vorliegt. Deshalb wurde ein Assay-System etabliert, welches die Kolo-kalisierung von transient exprimierten Kernproteinen im Heterochromatin ermöglicht. Dazu wurde zuerst die Verteilung des heterochromatischen Materials in einigen Zwiebelpflanzen untersucht. Die Arten *Scilla mischtschenkoana* sowie *Ornithogalum longibracteatum*, welche eine Heterochromatin-Verteilung vom „Chromozentren-Typ“ aufweisen, schienen für die transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen gut geeignet. Letztendlich wurde *Scilla* für den Partikelbeschuss gewählt, da hier zum einen eine gut zu präparierende Epidermis, aber auch ein mikroskopisch sehr gut zu beobachtendes Heterochromatin vorhanden ist. Dieses war auch cytologisch unter Verwendung von Antikörpern für die heterochromatische Markierung dimethyl-H3K9 gut sichtbar. Der Beschuss mit den Heterochromatin-assoziierten *Drosophila* Protein HP1 führte zu einer eindeutigen GFP-Fluoreszenz im Heterochromatin von *Scilla*. Auch die *Arabidopsis*-Proteine SUVH2 und SUVH3 waren in den *Scilla*-Kernen lokalisiert. SUVH2 zeigte dabei auch eine eindeutige Assoziation im Heterochromatin, während SUVH3 diffus im Kern verteilt war. Das *Scilla*-System ist somit gut geeignet für einen schnellen Test von Kernproteinen auf deren Lokalisierung im Chromatin, ohne die aufwendige Herstellung transgener Pflanzen. Auch eine Untersuchung einzelner Bereiche von Chromatinproteinen zur Analyse von Heterochromatin bindenden Domänen sollte in diesem System möglich sein.

4.4 Die Su(var)3-9 Homologen SUVH1 und SUVH2 sind Heterochromatin-assoziierte Proteine

Für die umfangreichen Analysen der Funktion von SUVH1 und SUVH2 in *Arabidopsis* wurden transgene Pflanzenlinien hergestellt. Dazu wurden sowohl der 35S* *CaMV*-Promoter (Mindrinos et al., 1994) als auch der Dexamethason-induzierbare *GVG*-Promoter (Aoyama et al., 1997) genutzt. Als Proteinfusion wurde zum einen c-myc als auch EGFP gewählt. Somit war es möglich, cytologische Analysen sowie *in vivo*-Studien der EGFP-Fusionskonstrukte durchzuführen. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen den c-myc Fusionsanteil wurden das transgen exprimierte *SUVH1* und auch *SUVH2* in den heterochromatischen Bereichen (Chromozentren) wiedergefunden, nachdem mit DAPI diese AT-reichen Regionen, Zentromere und zentromer-nahe Bereiche, gegengefärbt wurden. Auch *Arabidopsis thaliana* besitzt Zellkerne mit einer Heterochromatinverteilung vom „Chromozentren-Typ“, mit Hilfe von Antikörpern gegen heterochromatische Markierungen, wie dimethyl-H3K9, können diese Bereiche cytologisch gut charakterisiert werden. Auch die beiden *Drosophila* Heterochromatinproteine HP1 und SU(VAR)3-9 wurden als myc-Fusionskonstrukte in *Arabidopsis* exprimiert und immunocytoologisch analysiert. Beide Proteine sind ebenfalls im Heterochromatin assoziiert.

4.5 Überexpression von *Drosophila* HP1 in *Arabidopsis*

Die Expression von *Drosophila* HP1 sollte vor allem zur Analyse der Verteilung des Proteins in den *Arabidopsis*-Kernen dienen. Transgen exprimiertes *Drosophila* HP1 wurde dann auch tatsächlich in den Chromozentren beobachtet. Somit könnte ein evolutionär konservierter Transportmechanismus dazu führen, dass solche heterologe Proteine in *Arabidopsis* als funktionell erkannt werden und an bestimmte heterochromatische Bereiche binden. Offensichtlich wirkt das *Drosophila* HP1 funktionell ähnlich dem homologen *Arabidopsis*-Protein TFL2, welches auch eine wichtige Rolle bei der Regulation homeotischer Blütenentwicklungsgene besitzt (Kotake et al., 2003). Die Wirkung auf verschiedene Blütenentwicklungsgene nach der Expression von *Drosophila* HP1 deutet darauf hin. Bei der Untersuchung der Blüten, welche die homöotischen Transformation aufwiesen, wurden des öfteren Samen festgestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass immer noch ein sehr geringer Anteil der Antheren

funktionell ist und Pollen produziert. Die transgenen HP1 Pflanzen sind ansonsten überwiegend steril, aufgrund des Fehlens von Antheren bzw. Pollen. Dadurch ist auch die Lebensspanne der Pflanzen länger im Vergleich zum Wildtyp.

4.6 Expression von *Drosophila* SU(VAR)3-9 in *Arabidopsis thaliana*

Das *Drosophila* SU(VAR)3-9 Protein wurde ebenfalls in *Arabidopsis thaliana* transgen unter Kontrolle des 35S*-Promoters exprimiert. Phänotypische Effekte wurden in den untersuchten Generationen bis zur T4 nicht beobachtet. Ein Nachweis des Fusionsproteins in einem Westernblot wurde noch nicht durchgeführt. Es gelang ein immunocytologischer Nachweis des myc-SU(VAR)3-9 Proteins im Heterochromatin der *Arabidopsis*-Interphasekerne. Die Verteilung des *Drosophila* myc-SU(VAR)3-9 wurde in einigen *Arabidopsis*-Kernen auch außerhalb der Chromozentren beobachtet. Dies könnte eine Folge einer fehlerhafter Expression des Proteins sein. Für verschiedene SU(VAR)3-9 Mutanten in *Drosophila* wurde auch eine Umverteilung des Proteins außerhalb des heterochromatischen Zentromerbereiches gezeigt. Dabei ist jedoch nur die SET-Domäne von SU(VAR)3-9 in die Kontrolle der Heterochromatin-Assoziation von SU(VAR)3-9 involviert, Deletionen der SET-Domäne führen zu einer Umverteilung des Proteins im Heterochromatin (Schotta et al., 2002). Für das transgen in *Arabidopsis* exprimierte SU(VAR)3-9 sollte über Westernblot-Analysen bzw. auch RT-PCR Experimenten die korrekte Expression des myc-SU(VAR)3-9 Proteins in *Arabidopsis* kontrolliert werden, da die Verteilung des myc-SU(VAR)3-9 Proteins in den *Arabidopsis*-Kernen auch auf ein verkürztes Protein hindeuten könnte.

4.7 Überexpression von SUVH1 in *Arabidopsis thaliana*

Das SUVH1-Gen wurde sowohl konstitutiv als auch unter induzierten Bedingungen exprimiert. Auf den Selektionsplatten fiel bereits eine starke Verlängerung der Primärwurzeln in einigen Linien auf. Dabei war dieser Effekt auch in den Dexamethason induzierten Linien zu beobachten. Auch in den Wurzelhaaren der SUVH1-Linien wurden signifikante Veränderungen gefunden. Hier wurden Phänotypen beobachtet, welche auch bei Doppelmutanten für die Wurzelhaarentwicklung *rhd1,rhd3* sowie *rhd1,rhd4* (Schiefelbein und Somerville, 1990) gezeigt wurden. Diese Gene agieren in einem Netzwerk, in welchem RHD1 die Initiation der Wurzelhaar-

entwicklung steuert, RHD3 und RHD4 nachfolgend wiederum die Elongation der Wurzelhaare regulieren. SUVH1 könnte somit direkt RHD1 regulieren, aber auch auf RHD3 bzw. RHD4 wirken. Dabei ist auch eine Histonmethylierung regulatorischer Regionen der *RHD*-Gene denkbar, was zu einer Hypermethylierung von H3K9-Positionen nach *SUVH1*-Überexpression und dem Silencing des entsprechenden *RHD*-Gens und letztendlich zu dem beobachteten Phänotypen führen würde. Eine direkte Interaktion der RHD-Proteine mit SUVH1 wurden bis jetzt nicht gefunden. Auch wurden die Insertionsorte des *SUVH1*-Transgens noch nicht bestimmt. Eine regulatorische Wirkung von SUVH1 ist jedoch wahrscheinlicher als eine Insertion in ein *RHD*-Gen, da der *rhdl*, *rhdl3* Mutantenphänotyp auch nach induzierter Überexpression von *SUVH1* auftrat. Auch andere Daten deuten auf eine Funktion von SUVH1 in den Wurzeln hin. So die Expressionsanalysen der *SUVH1*-Promoter-*GUS* Konstrukte (*SUVH1::GUS*). Hier wurde eine spezifische Expression in der Suspensorregion des Embryos gefunden (P. Grini, pers. Mitteilung). Diese Region entwickelt sich später mit zur Primärwurzel des Keimlings. In späteren Keimlingen wird die *SUVH1*-Promoter-*GUS* Färbung vorwiegend in der Wurzelregion beobachtet, insbesondere in dem Meristembereich der Wurzelspitze. Interessanterweise zeigte die untersuchte T-DNA Linie von *SUVH1* (SALK 003675) keine Veränderungen im Wurzelphänotyp. Analysen in Kooperation mit P.Grini (Universität Oslo) zeigten auch, daß das *SUVH1* Transkript sehr früh exprimiert wird. Dabei erfolgt wahrscheinlich ein Imprinting des *SUVH1* Gens, da nur das maternale Genprodukt in frühen Embryos nachgewiesen werden konnte. Imprinting wurde auch für andere frühe Entwicklungsgene, wie *DEMETER* (Choi et al., 2002) und *MEDEA* (Grossniklaus et al., 1998) beobachtet. Sowohl das transgen exprimierte myc-SUVH1 Protein als auch das SUVH1-EGFP Fusionsprotein wurden nach der Überexpression in den heterochromatischen Bereichen gefunden. Eine mit der Proteinmenge des Transgens korrelierende ektopische Verteilung, wie bei myc-SUVH2, konnte weder in den myc-SUVH1 Linien noch in den induzierbaren SUVH1-GFP Linien gefunden werden.

4.8 Ektopische Chromatinbindung nach Überexpression von *SUVH2*

Als Vertreter der *SUVH2*-Gruppe wurde das *SUVH2*-Gen in *Arabidopsis* transgen unter konstitutiven 35S*-sowie dem induzierbaren *GVG*-Promoter exprimiert. Der beobachtete „mini-plant“-Phänotyp trat in 3 Linien auf, welche Einzelinsertionen des Transgens im Genom aufwiesen (K. Naumann, pers. Mitteilung). Die Westernblot-Analysen zeigten auch eine eindeutige Korrelation der Proteinmenge des *SUVH2*-Transgens mit diesem Phänotyp. Die stark erhöhte Transkriptmenge konnte auch in anderen Experimenten, wie DNA-CHIP, verifiziert werden. Da auch die Insertionsorte des *SUVH2*-Transgens bestimmt wurden, kann eine Insertion in regulatorische Wachstumsgene, z.B. des Giberellin- und Auxinstoffwechsels, als Ursache für den „mini-plant“-Phänotyp ausgeschlossen werden (K. Naumann, pers. Mitteilung). In den immunocytoologischen Aufnahmen war eine ektopische Verteilung des transgenen *SUVH2*-Proteins in den Linien mit hoher Transgenexpression zu beobachten. Dabei waren auch mit DAPI angefärbte Bereiche außerhalb der Chromozentren sichtbar. Diese korrelierten mit dem ektopisch verteilten myc-*SUVH2*. Offensichtlich führt die hohe Überexpression von *SUVH2* dazu, daß das Protein außerhalb der Chromozentren bindet und auch dort seine enzymatische Funktion als Histon-Methyltransferase wahrnimmt. Da *SUVH2* wahrscheinlich in Interaktion mit anderen Proteinen wirkt, kommt es zur Bindung anderer Proteine an *SUVH2* und zum Aufbau eines Silencing-Komplexes an euchromatischen Positionen im Genom, und einer Manifestierung von heterochromatischen Bereichen an diesen Orten. Dieses zusätzliche Heterochromatin in *SUVH2*-Überexpressionslinien konnte auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Kooperation mit G. Hause, Halle).

4.9 Histon-Methyltransferaseaktivität von *SUVH1* und *SUVH2* *in vitro* und *in vivo*

Zur Identifikation einer möglichen Histon-Methyltransferaseaktivität von *SUVH1* und *SUVH2* wurden sowohl die in *E.coli* rekombinant exprimierten Proteine verwendet, als auch immunocytoologische *in vivo*-Studien von Veränderungen der Histonmodifizierungen in den transgenen Pflanzen durchgeführt. Bei den rekombinant hergestellten GST-Fusionsproteinen zeigte sich in den Assays, daß nicht alle Präparationen des gleichen Proteins Aktivität aufwiesen. Für das *SUVH1*-Protein konnte bis jetzt überhaupt

noch keine Aktivität gezeigt werden. Offensichtlich benötigt das Protein für seine Aktivität andere Cofaktoren, die in den *in vitro*-Assays nicht angeboten werden konnten. Auch die Untersuchungen mit SUVH2 zeigten nur eine schwache Aktivität, wenn rekombinantes Histon H3 und H4 sowie synthetisch hergestellte Peptide (AS 1-20) des Histons H3 verwendet wurden. Das rekombinante SUVH2 ist erst im *in vitro*-Assay aktiv, wenn rekonstituierte rekombinante Nukleosomen als Substrat verwendet wurden. Dabei war eine Übertragung der Methylgruppen auf die Histone H3 und H4 zu beobachten. Dies zeigt, dass SUVH2 für seine Funktion offensichtlich die Nukleosomenstruktur bzw. auch DNA benötigt. Die Bindung des SUVH2 Proteins an Histone könnte dabei über die N-terminale YDG- Domäne bewirkt werden. Diese Bindung wurde bereits für ein anderes Chromatinprotein aus *Mus musculus*, Np95, gezeigt (Cittero et al., 2004). Dieses Protein besitzt eine der YDG-Domäne von SUVH2 homologe Region (SRA-YDG), welche wichtig für die Bindung an Histon H3 ist. Bei der Gruppe der SUVH-Proteine, welche keine YDG-Domäne besitzen, könnte diese Bindung an die Histone als Voraussetzung für die HMTase Funktion entweder direkt über ein anderes bisher noch nicht identifiziertes Aminosäuremotiv, oder aber indirekt über die Interaktion mit einem anderen histonbindenden Protein erfolgen.

4.10 Differentielle Effekte der Nullmutanten von *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH4* auf heterochromatische Histon- und DNA-Methylierung

Für die Untersuchung von Histonmodifizierungen *in vivo* wurden immunocytologische Analysen mit spezifischen Antikörper durchgeführt. Diese Antikörper wurden zuerst an Interphasekernen aus Wildtyp-Pflanzen getestet. Dabei konnten die einzelnen Histon- und DNA-Modifizierungen eu- bzw. heterochromatisch lokalisiert und zugeordnet werden. Schon Methylierungen an einer Histonposition unterschieden sich dabei in der Lokalisierung. H3K9 ist mono- und dimethyliert im Heterochromatin zu finden, eine weitere Methylierung zu trimethyl-H3K9 ist nur in euchromatischen Bereichen zu beobachten. Für dimethyliertes H3K27 wurde neben der heterochromatischen eine leichte euchromatische Färbung beobachtet, trimethyliertes H3K27 ist nur euchromatisch. Acetyliertes H3K9 ist ebenfalls euchromatisch. Diese Modifikation ist antagonistisch zu mono- und dimethyliertem H3K9. Da trimethyliertes H3K9 ebenfalls im Euchromatin gefunden wurde, ist wahrscheinlich eine Koexistenz von H3K9-Acetylierung und –Trimethylierung möglich, oder es werden verschiedene modifizierte Histone immuno-

cytologisch gleichzeitig beobachtet. H3K36 ist in allen Methylierungsstadien euchromatisch. H4K20 ist nach der Monomethylierung heterochromatisch, dimethyl-H4K20 und trimethyl-H4K20 ist, im Unterschied zu Tieren (Ebert et al, 2004), in *Arabidopsis* euchromatisch. Phosphoryliertes H3S10 wurde ebenfalls in den heterochromatischen Bereichen gefunden. Diese Phosphorylierung wurde u. a. in humanen HeLa Zellen und in Zellkulturen von *Muntiacus muntjak* spezifisch im pericentrischen Heterochromatin nachgewiesen und ist hier in die fortschreitende Chromatinkondensation während der beginnenden Mitose involviert. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Phosphorylierung von H3S10 Teil eines molekularen Mechanismus ist, welcher die mitotische Chromosomenkondensation initialisiert (Hendzel et al., 1997). Für die Analyse der Veränderung von Histonmodifikationen in der T-DNA Insertionslinie von *SUVH1*, *SUVH2* sowie *SUVH4* wurden spezifische Antikörper verwendet. Bei der T-DNA Insertionslinie von *SUVH1* konnten keine signifikanten Veränderungen in allen heterochromatischen Histon- und DNA-Modifikationen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die quantifizierenden Westernblot-Analysen bestätigen diese Ergebnisse. Auch die euchromatischen Histonmodifikationen blieben in diesen Insertionslinien unbeeinflusst. Offensichtlich spielt *SUVH1* nur eine untergeordnete Rolle für die Methylierung von H3K9 und Gen-Silencing. Da in der *SUVH1*-Gruppe noch andere homologe Gene vorhanden sind (*SUVH3*, *SUVH7*, *SUVH8*, *SUVH10*), ist auch die Möglichkeit einer funktionellen Redundanz gegeben, was durch die Untersuchung von Doppel- oder Tripelmutanten nachgewiesen werden könnte. Auch durch die anderen Mitglieder der *SUVH*- und *SUVR*-Proteinfamilie könnte die Funktion von *SUVH1* als H3K9-HMTase substituiert werden. Die Expression von *SUVH1* erfolgt sehr früh im Embryo. Hier ist auch eine zeitlich begrenzte Aktivität von *SUVH1* als HMTase, oder durch die beobachtete spezifische Expression in der Wurzel, eine Organspezifität denkbar.

Die T-DNA Insertionslinien des *SUVH4*-Gens sollte ursprünglich als vergleichende Kontrolle für die immunocytoologisch sichtbare Veränderung verschiedener heterochromatischer Histonmethylierungen in dieser Arbeit genutzt werden. Die in anderen Publikationen beschriebene starke Veränderung der H3K9-Dimethylierung in *svh4*- und *kyp-2* Mutanten, beobachtet wurden Umlagerungen von dimethyliertem H3K9 aus den Chromozentren in das Euchromatin (Jasencakova et al., 2003; Jackson et al., 2004), konnten nicht bestätigt werden. Die dimethyl-H3K9 Antikörperfärbung unterschied sich in allen für diese Arbeit untersuchten *svh4*-Mutantenallelen, SALK 105815 sowie *kyp-*

2, nicht signifikant vom Wildtyp. Lediglich in den Westernblot-Analysen konnte in *suvh4*-Mutanten eine Reduzierung von dimethyl-H3K9 beobachtet werden. Ein Grund für diese grundlegenden Unterschiede in den immunocytologischen Analysen könnte die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen dimethyl-H3K9 sein. Auch für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen dimethyl-H3K9 wurde eine unterschiedliche Lokalisierung im Chromatin in Abhängigkeit von den verwendeten Chargen beobachtet. Dimethyl-H3K9 Antikörper mit euchromatischer Lokalisierung wurden dann nicht mehr verwendet. Immunocytologisch wurden für die untersuchten T-DNA Insertionslinien von *SUVH1*, *SUVH2* und *SUVH4* keine Veränderung in den euchromatischen Histonmodifizierungen festgestellt. Sollte es hier Veränderungen geben, so sind solche nur schwer quantifizierbar.

4.11 Ektopische Heterochromatisierung durch SUVH2-Überexpression

Zur Analyse von Veränderungen der Histonmodifizierungen *in vivo* wurden Linien mit konstitutiver Expression von *SUVH2* (*CaMV 35S**-Promoter) unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Dabei zeigte sich, daß in den *SUVH2*-Überexpressionslinien auch die heterochromatischen Histonmarkierungen mono- und dimethyl-H3K9, mono- und dimethyl-H3K27 sowie monomethyl-H4K20 ektopisch im Chromatin verteilt sind. Diese Befunde korrelierten mit der Verteilung des überexprimierten myc-SUVH2 Fusionsproteins, welches ebenfalls an Positionen außerhalb der Chromozentren bindet. Hier wird SUVH2 wahrscheinlich auch als Histon-Methyltransferase tätig, wobei eine Aktivität für alle beobachteten heterochromatischen Markierungen eher unwahrscheinlich ist. Denkbar ist vielmehr eine direkte Aktivität für dimethyl-H3K9 sowie monomethyl-H4K20, da für diese Positionen auch eine drastische Reduktion in den T-DNA Insertionslinien von *SUVH2* gefunden wurde. Alle anderen heterochromatischen Histonmarkierungen werden offensichtlich übergeordnet ohne eine direkte Übertragung von Methylgruppen durch SUVH2 reguliert. Ähnlich sieht es mit der immunocytologisch sichtbaren Veränderung der DNA-Methylierung aus. Hier ist eine direkte Verbindung zwischen Veränderungen der DNA- und Histonmethylierung zu erkennen. Für die Interaktion dieser beiden Prozesse sind zwei alternative Modelle in der Diskussion. Zum einen ist die DNA-Methylierung abhängig von der Histonmethylierung (Tamaru und Selker, 2002; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002; Lindroth et al., 2004) oder die Initiation der Histonmethylierung

erfolgt nach der Methylierung der DNA (Johnson et al., 2002; Soppe et al., 2002; Tariq et al., 2003). Wahrscheinlich erfolgt wohl eine beiderseitig abhängige Methylierung von Histonen und DNA als sukzessiver Prozess. Betrachtet man die euchromatischen Histonmodifizierungen, so ist insbesondere bei acetyl-H3K9, dimethyl-H3K4, trimethyl-H3K9 sowie trimethyl-H3K27 eine Reduzierung nach *SUVH2*-Überexpression zu erkennen. Diese Beobachtung würde mit der Verstärkung der heterochromatischen Methylierungen korrelieren, da sich offensichtlich euchromatische und heterochromatische Histonmodifikationen gegenseitig ausschließen. Eine Verstärkung der H3K9-Dimethylierung würde somit eine Verringerung der Acetylierung an H3K9 bedeuten, da die Methylierung an dieser Position eine Hypoacetylierung (Deacetylierung) voraussetzt. Somit wird durch die Überexpression von *SUVH2* das regulatorische Gleichgewicht der eu- und heterochromatischen Histonmodifikationen zu Gunsten der heterochromatischen Histonmethylierung verschoben und damit eine der Voraussetzungen für zusätzliches ektopisches Silencing im Genom gegeben.

4.12 Differentielle Modifizierung der DNA-Methylierung durch Nullmutation und Überexpression von SUVH2

Die Untersuchung der dosisabhängigen Modifikation der DNA-Methylierung wurden anhand der Veränderung des Silencing von Transgenen durchgeführt. Dazu wurden die ausgewählte Markergene *GLUCURONIDASE* sowie *LUCIFERASE* verwendet. Die Eignung von *LUC* und *GUS* für die Analyse von Transkriptionellen Gen-Silencing (TGS) wurde bereits in anderen Arbeiten erfolgreich nachgewiesen (Morel et al., 2000; Takeda et al., 2004). Die Überexpression von *SUVH2* hat einen signifikanten Effekt auf die Verstärkung des Silencing dieser beiden Transgene. Dabei spielt offensichtlich die Hypermethylierung von DNA, vorrangig von asymmetrischen Sequenzmotiven, eine entscheidende Rolle. Dies konnte unter Verwendung der Bisulfid-Sequenzierung für die einzelnen Cytosinpositionen ausgewählter Bereiche der Transgene nachgewiesen werden. Der Mechanismus der Inaktivierung durch DNA-Hypermethylierung konnte auch für das Athila-Transposon auf Sequenzebene unter Verwendung der Bisulfid-Sequenzierung beobachtet werden. *SUVH2* ist also offensichtlich nicht nur an der Kontrolle der Expression von zusätzlich in die Pflanze eingebrachten Transgenen beteiligt, sondern auch für das Silencing von transponiblen Elementen mit verantwortlich. Signifikante Veränderungen der Expression solcher transponiblen Elemente in

Arabidopsis nach Überexpression von SUVH2 sowie in *SUVH2* T-DNA Insertionsmutanten wurden auch in DNA-Chip Analysen (AFFYMETRIX) beobachtet (K. Naumann, pers. Mitteilung).

SUVH2 kommt damit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression von Transgenen und transponiblen Elementen zu. Die Inaktivierung solcher für den pflanzlichen Organismus oft nachteiligen Gene ist ein wichtiger Mechanismus für das Überleben der Pflanzen, ein Überangebot dieser Elemente kann die Expression sämtlicher endogener Gene in der Zelle stören. Dabei spielt SUVH2 aber offensichtlich keine primäre Rolle bei der Methylierung der DNA, konservierte Bereiche für DNA-Methylasen wurden nicht gefunden. Vielmehr kommt eine übergeordnete Kontrolle der Cytosinmethylierung im Zusammenspiel mit anderen DNA-Methylasen in Frage. Diese Interaktion konnte in Kreuzungsanalysen mit Mutantenallelen von *MET1*, *DDM1* sowie *CMT3* gezeigt werden. Dabei wurde der Enhancereffekt von SUVH2 auf das Silencing von Transgenen vor allem durch das *MET1*-Mutantenallel supprimiert. MET1 ist eine der wichtigsten DNA-Methylasen. MET1 ist spezifisch für die Methylierung des symmetrischen DNA-Sequenzmotivs CpG verantwortlich. Die *met1*-Mutanten zeigen eine charakteristische Hypomethylierung in den Sequenzmotiven CpG sowie in CpNpG, wobei letzteres Motiv nicht primär durch MET1 beeinflusst wird. Die Funktion von MET1 für die gesamte DNA-Methylierung (Finnegan und Kovac, 2000) beeinflusst hierbei auch alle anderen Sequenzmotive der symmetrischen und asymmetrischen DNA-Methylierung. Auf dieser übergeordneten Ebene funktioniert wahrscheinlich die Regulation von SUVH2 durch MET1. In den Bisulfid-Analysen wurden vor allem signifikante Änderungen der asymmetrischen DNA-Methylierung nach SUVH2-Überexpression (Hypermethylierung) bzw. in den Antisense- und T-DNA Insertionslinien (Hypomethylierung) gefunden. Neben der Interaktion mit der „Maintenance“-Methylase MET1 ist hierbei natürlich auch die Regulation anderer, insbesondere auch für die asymmetrische Methylierung spezifischer DNA-Methyltransferasen, wie DRM1 und DRM2, zu vermuten, was in späteren Analysen geprüft werden soll. Eine weitere Interaktion besteht zwischen DDM1 und SUVH2, hierbei wird der „mini-plant“-Phänotyp von SUVH2 noch stärker in der *ddm1-h1* Mutante supprimiert, als in der *met1-h1* Mutante. Die Hypomethylierung des *LUCIFERASE*-Transgens in der *ddm1-h1/LUC*-Linie wird von der SUVH2-Überexpression im Gegenzug nicht beeinflusst (I. Hofmann, pers. Mitteilung). Somit ist die Funktion von SUVH2 vorrangig von DDM1,

dann von MET1 abhängig. Zwischen CMT3 und SUVH2 erfolgt wahrscheinlich keine funktionelle Interaktion.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung neuer SET-Domänenproteine aus *Arabidopsis thaliana*. Da die Funktion dieser Proteine nicht bekannt war, wurde zuerst die Lokalisierung der Fusionsproteine in transienten Assaysystemen (*Allium cepa*) untersucht. Dabei konnte die Kernlokalisierung aller untersuchten Proteine nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Heterochromatin-Assoziation von Fusionsproteinen wurde ein neues transientes Expressionssystem in *Scilla mischtschenkoana* etabliert. Dadurch kann mit geringem Zeitaufwand die Bindung von EGFP-fusionierten Chromatinproteinen an heterochromatische Bereiche des Zellkerns nachgewiesen werden. Für das Heterochromatin-assoziierte Proteine HP1 aus *Drosophila melanogaster* konnte diese Lokalisierung ebenso erfolgreich gezeigt werden wie für SUVH2 aus *Arabidopsis thaliana*.

Zur Analyse der Funktion von SUVH1 und SUVH2 in *Arabidopsis thaliana* wurden transgene Pflanzenlinien hergestellt, welche diese beiden Chromatingene konstitutiv exprimierten. Antikörperfärbungen gegen den myc-Fusionsanteil dieser transgen exprimierten Proteine zeigten eine eindeutige Assoziation von SUVH1 und SUVH2 im Heterochromatin. Für die beiden Chromatinproteine aus *Drosophila*, SU(VAR)3-9 und HP1, konnte ebenfalls eine Lokalisierung im Heterochromatin von *Arabidopsis* nachgewiesen werden.

Nach der Überexpression von *SUVH1* wurde eine phänotypische Veränderung der Wurzelhaare gefunden, eine Rolle bei der Regulation der Wurzelentwicklung durch SUVH1 ist denkbar. Andere Daten, wie die *SUVH1* Promoter-*GUS* Lokalisierungen und RT-PCR Analysen sprechen ebenfalls für diese Hypothese.

Die Überexpression von *SUVH2* führt zu drastischen phänotypischen Effekten, die auch immunocytoologisch in einer ektopischen Verteilung des transgenen SUVH2 Proteins beobachtet werden konnten. Die SET-Domänengene *SUVH1* und *SUVH2* kodieren für Histon-Methyltransferasen. Für SUVH2 konnte diese Aktivität *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. *In vitro*-Assays mit rekombinantem SUVH2 Protein ermöglichten den Nachweis einer Histon-Methyltransferaseaktivität, die spezifisch für H3 und H4 ist. Dabei wurden vorrangig Nukleosomen als Substrat methyliert. In immunocytoologischen Analysen wurde eine ektopische Verteilung aller hetero-

chromatischen DNA- und Histonmethylierungen in den Interphasekernen der SUVH2-Überexpressionslinien beobachtet. Im Gegensatz dazu waren in den Antisense und T-DNA Insertionslinien von *SUVH2* diese DNA- und Histonmodifizierungen reduziert. Diese Veränderungen konnten auch in Westernblot-Analysen quantifiziert werden. In *suvh1*- und *suvh4*-Linien sowie im *kyp-2* Mutantenallel wurden keine signifikanten immunocytologischen Veränderungen der Histon- und DNA-Modifikationen beobachtet.

Die Überexpression von *SUVH2* korreliert mit genomweiten Silencing-Effekten und Hypermethylation von DNA. Diese Hypermethylation konnte auf Sequenzebene mittels Bisulfid-Sequenzanalysen ausgewählter Transgene festgestellt werden. *SUVH2*-Antisense- und T-DNA Insertionslinien zeigten im Gegensatz dazu eine Hypomethylierung der DNA. Diese Veränderungen der Cytosinmethylierung betrafen vor allem die asymmetrischen Methylierungsmotive. Somit konnte eine Verbindung zwischen der bereits in Kreuzungsanalysen festgestellten Interaktion mit den DNA-Modifikatoren MET1 und DDM1 und der Histonmodifizierung durch SUVH2, d. h. eine gegenseitige Abhängigkeit von DNA- und Histonmethylierung, gezeigt werden.

6. Literatur

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P. B., Reuter, G., Jenuwein, T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.*, **18**, 1923-1938.
- Akhtar, A., Zink, D., Becker, P. B. (2000) Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**, 405-409.
- Alvarez-Venegas, R., Avramova, Z. (2001) Two *Arabidopsis* homologs of the *Drosophila* Trithorax genes; Identification of a new structural domain. *Gene* **271**, 215- 221.
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., Avramova, Z. (2003) ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Current Biology*, **13**, 627-637.
- Amadeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Mittelsten Scheid, O., Paszkowski, J. (2000) Disruption of the plant gene *MOM* releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature*, **405**, 203-206.
- Aoyama, T. und Chua, N-H. (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.*, **11**, 605-612.
- Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Bartee, L. und Bender, J. (2001) Two *Arabidopsis* methylation-deficiency mutations confer only partial effects on a methylated endogenous gene family. *Nucl. Acid Res.*, **29**, 2127-2134.
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G., Aalen, R. (2001) The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionary conserved classes. *Nucl. Acid Res.*, **29**, 4319-4333.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, **316**, 1194-1199.

- Berger, R. und Greilhuber, J. (1993) C-bands and chiasma distribution in *Scilla amoena*, *S.ingridae* and *S.mischtschenkoana* (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* **184**, 125-137.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) *Nucl. Acid. Res.* **7**, 1513-1519.
- Brandstädter, J., Rossbach, C. Theres, K. (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta*, **192**, 69-74.
- Cao, X. und Jacobson, S. E. (2002) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16491-16498.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298** (5595), 1039-43.
- Cermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., Pirrotta, V. (2002) *Drosophila* Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal polycomb Sites. *Cell*, **111**, 185-196.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y. H., Sung, Z.R., Goodrich, J. (2004) Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, **131**, 5263-5276.
- Chaudhury, A. M., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E. S., Peacock, W. J. (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4223-8.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., Fischer, R. L. (2002) DEMETER, a DNA Glycosylase Domain Protein, Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in *Arabidopsis*. *Cell*, Vol. **110**, 33-42.
- Chuang, R.Y. und Kelly, T.J. (1999) The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2656-2661.
- Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., Di Fiore, P. P., Bonapace, I. M. (2004) Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol*, **24** (6), 2526-35.
- Clegg, M.T., Cummings, M.P., Durbin, M.L. (1997) The evolution of plant nuclear genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, (15), 7791-8.
- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T., Reuter, G. (2004) Distinct H3-K9 methylation states define domains for epigenetic gene

- silencing in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **18**(23), 2973-83.
- Finnegan, E.J. und Kovac, K.A. (2000) Plant DNAmethyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **43**, 189-201.
- Fischle, W., Wang, Y., Allis, C.D. (2003) Extending the histone code: modification cassettes and switches. *Nature*, **425**, 475-479.
- Fransz, P., Armstrong, S., de Jong, J.H., Parnell, L.D., van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bisseling, T., Jones, G.H. (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere regions. *Cell* **100**, 367-376.
- Gendall, A. R., Levy, Y. Y., Wilson, A., Dean, C. (2001) The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell* **107**(4), 525-535.
- Gendrel, A.-V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V., Martienssen, R.A. (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDM1*. *Science* **297**, 1871-1873.
- Goodrich, J., Puangsomiee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E., Coupland, G. (1997) A *Polycomb*-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*, **386**, 44-51.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L., Zhu, J.K. (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, **111**(6), 803-14.
- Goto, K. und Meyerowitz, E.M. (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.*, **8**, 1548-1560.
- Goyon, C., Nogueira, T.I., Faugeron, G. (1994) Perpetuation of cytosine methylation in *Ascobolus immersus* implies a novel type of maintenance methylase. *J Mol Biol.*; **240**(1), 42-51.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M.A., Gagliano, W.B. (1998) Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science*, **280**, 446-450.
- Guitton, A. E., Page, D. R., Chambrier, P., Lionnet, C., Faure, J. E., Grossniklaus, U., Berger, F. (2004) Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131**(12), 2971-81.

- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., Allis C.D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. **106**(6), 348-60.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *A. tumefaciens* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**, 9877.
- Hofmann, I. (2004) Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von Suppressormutanten für *Transcriptional Gene Silencing* in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation
- Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C. R., Schubert, I. (2003) Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant Journal*, **33**, 967-973.
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806.
- Ivanova, A.V., Bonaduce, M.J., Ivanov, S.V., Klar, A.J.S. (1998) The chromo and SET domains of the Clr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature Genet.*, **19**, 192-195.
- Jasencakova, Z., Soppe, W.J.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B., Schubert, I. (2003) Histone modification in *Arabidopsis* – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The Plant Journal*, **33**, 471-480.
- Jackson, J.P, Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., Perez Burgos, L., Singh, P.B, Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T., Jacobsen, S. E. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, **112**, 308-15.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobson, S.E. (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the *KRYPTONITE* histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556-560.
- Jacobsen, S.E. und Meyerowitz, E.M. (1997) Hypermethylated *superman* epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 1100-1103.
- Jack, T., Brockman, L. L., Meyerowitz, E. M. (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamen. *Cell* **68**, 683-697,
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E. (2002) Control of CpNpG DNA

- methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556-560.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards, E.J. (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.*, **22**, 94-97.
- Jenuwein, T. und Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 80-93.
- Johnson, L.M., Vao, X., Jacobsen, S.E. (2002) Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Current Biol.*, **12**, 1360-1367.
- Jones R.S. und Gelbart W. M. (1993) The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol.* **10**, 6357-66.
- Katz, A., Oliva, M., Mosquna, A., Hakim, O., Ohad, N. (2004) FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J.*, 37(5):707-19.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* **39**, 499-509.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L., Richards, E.J. (2003) *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, **163**, 1109-1122.
- Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Margossian, L., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Fischer, R. L. (1999) Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(7):4186-91.
- Kohler, C., Hennig, L., Bouveret, R., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., Grissem, W. (2003) *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J.*, 22(18):4804-14.
- Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M., Goto K. (2003) *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER 2 Gene Encodes a Heterochromatin Protein 1 Homolog and

- Represses both *FLOWERING LOCUS T* to Regulate Flowering Time and Several Floral Homeotic Genes. *Plant Cell Physiol.* **44** (6), 555-564.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lachner M., O'Sullivan R. J., Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci.*, **116**, 2117-24.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., Jenuwein, T. (1997) Mammalian homologs of the *Polycomb*-group gene *enhancer of zeste* mediate gene silencing in *Drosophila melanogaster* and *S.cerevisiae* telomeres, *EMBO J.*, **16**, 3219-3232,
- Laible, G., Hayness, A.R., Lebersorger, A.O.C.D., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D.M., Jenuwein, T. (1999) The murine *polycomb*-group genes *Ezh1* and *Ezh2* map close to *Hox* gene clusters on mouse chromosomes 11 and 6. *Mamm. Genome*, **10**, 311-314
- LaJeunesse, D. und Shearn, A. (1996) E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development.* **122**(7), 2189-97.
- Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., Khorasanizadeh, S. und Jacobsen SE. (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J.*; **23**(21):4286-96.
- Liu, L.S., White, M.J., MacRae, T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants-functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 247-257
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., Martienssen, R. (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLOS Biology*, **1**, 420-428.
- Loidl, P. (2003) A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci.*, **9**, 84-90.
- Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W. J., Chaudhury A. (2000) Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA* and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**(19):10637-10642,
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H., Jaenisch, R. (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **408**(6812):538-40.
- Lynch, M. und Conery, J. S. (1997) The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicated Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(15):7791-8.

- Nislow, C., Ray, E., Pillus, L. (1997) SET1, a yeast member of the *Trithorax* family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol.Biol.Cell* **8**, 2421-2436.
- Ma, Q., Alder, H., Nelson, K.K., Chatterjee, D., Gu, Y., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M., Siracusa, L.D., Bucherberg, A.M. (1993) Analysis of the murine ALL-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 6350-6354,
- Malagnac, F., Bartee, L., Bender, J. (2002) An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.*; **21**(24):6842-52.
- Martienssen, R.A. und Colot, V. (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, **293**, 1070-1074.
- Malagnac, F., Bartee, L., Bender, J. (2002) An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.*, **21**, 6842-6852.
- Mazo, A., Huang, D-H., Mozer, B., Dawid, I. (1990) The *trithorax* gene, a *trans*-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**, 2112-2116.
- Meyerowitz, E.M. und Somerville, C.R. *ARABIDOPSIS*. Cold Spring Harbor Press. 1994
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.L., Asubel, F.M. (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene RPS encodes a protein containing nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, **78**, 1089-1099.
- Mittelsten Scheid, O., Asfar, K., Paszkowski, J. (1998) Release of epigenetic silencing by *trans*-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 632-637.
- Mittelsten Scheid, O., Probst, A.V., Afsar, K., Paszkowski, J. (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13659-13662.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Beclin, C., Vaucheret, H. (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **10**(24), 1591-4.
- Murashige, T., und Skoog, F.(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.

- Nakayama, J., Rice, J.D., Strahl, B.D., Allis, C.D., Grewal, S.I.S. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss V., Phalke, S., Irmeler K., Hause, G., Aurich, A.-C., Dorn, R., Jenuwein, T., Reuter G. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **24**, 1418-1429.
- Nowak, S.J. und Corces, V.G. (2000) Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.*, **14** (23), 3003-13.
- Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y. C., Williams, C., Repetti, P., Fischer, R. L. (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 193(11):5319-24.
- Okano, M., Xie, S., Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**(3), 219-20.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucl. Acid Res.*, **30**, 5036-5055.
- Paro, R., und Harte, P.J. (1996) The role of Polycomb group and trithorax group chromatin complexes in the maintenance of determined cell states. In: V.E.A. Russo, R.a. Martienssen und A.D. Riggs (Eds.) *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 507-520.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T. (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferase impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-337.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H.A., Jenuwein, T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, **12**, 1577-1589.
- Ramsahoye, B.H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., Jaenisch, R. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U SA*, **97** (10), 5237-42.

- Rastelli, L., Chan, C.S., Pirotta, V. (1993) Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on enhancer of zeste function. *EMBO J.*, **12**, 1513-1522.
- Rayasam, G. V., Wendling, O., Angrand, P. O., Mark, M., Niederreither, K., Song, L., Lerouge, T., Hager, G. L., Chambon, P., Losson, R. (2003) NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO J.* **16**;22(12):3153-63.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**(3), 615-23.
- Sanger F., Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-7.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G. (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.*, **21**, 1121-1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* **18**(11), 1251-62.
- Schiefelbein, J.W. und Somerville, C. (1990) Genetic Control of Root Hair Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **2**(3), 235-243.
- Selker, E.U., Fritz, D.Y., Singer, M.J. (1993) Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. *Science*, **262**(5140), 1724-8.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119** (7), 941-53.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., Fransz, P. (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **21**, 6549-6559.

- Spillane C, MacDougall C, Stock C, Kohler C, Vielle-Calzada JP, Nunes SM, Grossniklaus U, Goodrich J. (2000) Interaction of the *Arabidopsis* polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes. *Curr Biol.*,10(23):15358.
- Springer, N.M., Napoli, C.N., Selinger, D.A., Pandey, R., Cone, K.C., Chandler, V.L., Kaeppeler, H.F., Kaeppeler, S.M. (2003) Comparative analysis of SET domain proteins in maize and *Arabidopsis* reveals multiple duplications preceding the divergence of monocots and dicots. *Plant Physiol.* **132**, 907-925.
- Stahl, B.D. und Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-4.
- Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., Harte, P.J. (1995) The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.*, **52**, 209-223.
- Schweizer, D. Distamycin-DAPI bands: properties and occurrence in species. Kew Chromosome Conference II. 1983.
- Tamaru, H. und Selker, E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**, 277-283.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A., Lichota, J., Habu, Y., Paszkowski, J. (2003) Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8823-8827.
- Thorstensen, T., Fischer, A., Johnsen, S.S., Reuter G., Aalen, R.B. (2005). The *Arabidopsis* SUV4 protein is a nucleolar histone H3 Lys 9 methyltransferase containing a new plant specific protein domain. In Vorbereitung.
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A.V., Angelis, K.J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O.M., Shibahara, K., Scheel, D., Paszkowski, J. (2004). BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **18**(7), 782-93.
- Tripoulas, N., Lajeunesse, D., Gildea, J., Shearn, A. (1996) The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics*, **143**, 913-928.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., Reuter, G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene

- Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.*, **13**, 3822-3831.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E., Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- van Lohuizen M. (1998) Functional analysis of mouse Polycomb group genes. *Cell Mol Life Sci.*, **54**(1), 71-9.
- Vielle-Calçada, J.P., Thomas, J., Spillane, C., Coluccio, A., Hoepfner, M.A., Grossniklaus, U. (1999) Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis* *MEDEA* locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Dev.*, **13**, 2971-2982.
- Wagner, D. (2003) Chromatin regulation of plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 20-28.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**(1), 99-109.
- Yadegari, R., Kinoshita, T., Lotan, O., Cohen, G., Katz, A., Choi, Y., Katz, A., Nakashima, K., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Fischer, R. L., Ohad, N. (2000) Mutations in the FIE and MEA genes that encode interacting polycomb proteins cause parent-of-origin effects on seed development by distinct mechanisms. *Plant Cell*, **12**(12):2367-2382.
- Yang C. H., Chen L. J., Sung Z. R. (1995) Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the EMF genes. *Dev Biol.*, **169**(2):421-35.
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z. R., Takahashi, S. (2001) EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**(11):2471-81
- Zemach, A. und Graf, G. (2003) Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *The Plant Journal*, **34**, 565-572.

7. Anhang

7.1 Herstellung der Fusionskonstrukte für transiente Assays

Für den Beschuß der Epidermiszellen von *Scilla* und *Alium* wurden die Vektoren pKEX4tr-GUS und pKEX4tr-GFP genutzt. Für pKEX4tr-GUS wurde das *BamHI/SacI* GUS-Fragment aus pBI221 (Clontech, Heidelberg) in die *BamHI/SacI* Schnittstelle des Vektors pKEX4tr (Van den Ackerveken et al., 1996) einkloniert. Die Schnittorte *Sall*, *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI* befinden sich „in frame“ mit dem Start ATG von GUS und dienen der Klonierung der Gene für die GUS-Fusion. GUS befindet sich nach der Expression im N-terminalen Bereich des Fusionsproteins.

Für pKEX4tr-GFP wurde das *BamHI/SacI*-GUS-Fragment gegen das PCR-amplifizierte *BamHI/SacI* EGFP-327 Fragment ausgetauscht, die Klonierungsstellen *Sall*, *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI* blieben erhalten, GFP befindet sich im N-terminalen Bereich der Proteinfusion.

7.2 Konstruktion des binären Vektors pBI 1,4 t-myc

Zur transgenen Expression der unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten Gene wurde ein geeigneter Vektor konstruiert, in welchen diese Gene als myc-Fusionsproteine unter Kontrolle des *CaMV 35S**-Promoters in *Arabidopsis* exprimiert wurden. Der nur schwach aktive *CaMV 35S**- Promoter (Mindrinos et al., 1994) wurde gewählt, um negative Überexpressionseffekte zu minimieren. Ausgangspunkt der Konstruktion von pBI1,4t-myc war der binäre Vektor pBI121 (Clontech), in dessen *HindIII*-Schnittstelle eine Expressionskassette kloniert wurde, welche aus dem *CaMV-35S**-Promoter, einer MCS mit den Schnittorten *EcoRI*, *XhoI* und *NotI* und einem *nos*-Terminator besteht. Über PCR-Klonierung wurde ein *EcoRI/Sal* -Konstrukt mit einem dreifachen Repeat des *myc*-Gens (AG T. Jenuwein, Wien) in den Vektor pBI1,4t ligiert. In den so entstandenen pBI1,4t-myc Vektor wurden die zu untersuchenden Gene kloniert und als myc-Fusion in der Pflanze exprimiert.

7.3 Etablierte bzw. verwendete Pflanzenlinien

Linien	Anzahl Linien in Generation				
	T0	T1	T2	T3	T4
35S*::mycSUVH1	12	35	125	248	
35S*::mycSUVH1as	12	27	138	203	
35S*::mycSUVH2	12	24	256	578	
35S*::mycSUVH2as	12	25	200	195	
35S*::mycHP1 <i>Dm</i>	12	36			
35S*::mycSU(VAR)3-9 <i>Dm</i>	12				
SUVH1::GUS	12				
GVG::SUVH1GFP	12	20			
GVG::SUVH2GFP	12	26			
T-DNA-Insertionslinien					
SALK 003675 (SUVH1)					
SALK 079574 (SUVH2)					
SALK 130630 (SUVH4)					
SALK 105816 (SUVH4)					

7.4 Verwendete Primer

Primer	Sequenz
SUVH1 Start	ATAGTCGACCGCATGGAAAGAGGTGGTCAC
SUVH1 Stop	ATAGTCGACTCCAAATGAGCCACGGCAATACGC
SUVH1 291	ATAGGATCCCAATCTTCTGACCAAAAAG
SUVH1 eco 1430	ATAGAATTCACCTGCATTCATATATCAT
SUVH1 bam 1140	ATAGGATCCTGAAGGCACACCCGTCTT
SUVH1 911	ATACTCGAGACTATCTCTACGCAAC
SUVH1 DOA	GGATCCGAACCCAGGAGAAATGGTCC
SUVH1 gen start	GAATTCCTTGTGTGTGTGTGGCTACGC
SUVH1 gen stop	GGATCCAGCTAAAAATCAAATTCCTTTGAATC
3-9 start	TATGAATTCCGCATGGCCACGGCTGAAGCC
3-9 stop	TATGGATCCAAAGAGGACCTTTCTGC
clf-A-Not	TATGCGGCCGCATGGCGTCAGAGGCTTCGCCTTC
clf-B-Not	ATAGCGGCCGCTAAGCAAGCTTCTTGGGTCTAC
SUVH3 start	ATACTCGAGCGCATGCAAGGAGTTCC
SUVH3 stop	ATACTCGAGTCATCCGAATGAACCAC
HP1 Eco	TATGAATTCCGCATGGGCAAGAAAATCGACAACCCTGACAGCT CG
HP1 Bam	TATGGATCCATCTTCATTATCAGAGTACC
HP1 myc2	ATAGCGGCCGCTTAAGAGTTGGTTGGGTG
AP3 start	ATAGAATTCGCATGGCGAGAGGGAAGATCCAG
AP3 stop	TATCTCGAGTTCAAGAAGATGGAAGGTAAT
AP3F 258	AATGCAAGAAACCAAGAGGAAA
AP3R460	TCTTTTTCTTGGTGGTCTCGAT
Pistillata R 55	CATGATCTCTCATCATTCCTC
Pistillata F327	GGGGGAAGATATACAGTCTCTCAA
GUS 1576 rev	ATACTCTTCACTCCACAT
ATHILA 817	TGAGGATGGGATAGAATAG
ATHILA back	ATTAATCCCTAAAACACTATCTT
18SrDNA R478	TTAGCGACAAAGGGCTGAAT
18SrDNA F214	CGCCTCTAAGTCAGAATCCG
GUS start	ATAGGATCCATGTTACGTCCTGTAGAAACCC
GUS stop	ATAGGATCCTTGTTCCTCCCTGCTG
35S-1HindIII	GAAAGAATGCTAACCCACAGATG
LB Hind	GCTGCGTAAGCCTCTCATACCATCTG
GUS ORF ende	CTCGAGTCATTGTTTCCTCCCTGCTG
pBI1	AACCATCTGTGGGTAGCAT

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft, und die konstruktive Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes sowie die Vermittlung hilfreicher Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen.

Ingo Schulz danke ich für die Einweisung und Unterstützung bei den molekularen Arbeiten.

Anne-Cathleen Aurich und Kristina Irmeler danke ich für die Durchführung und Mithilfe der transienten Assays und proteinbiochemischen Arbeiten.

Kathrin Naumann, Ingo Hofmann, Gerd Hause und Katrin Kittlaus sowie Veiko Krauss danke ich für die Diskussion sowie der Bereitstellung von Material für diese Arbeit.

Prof. Dr. D. Schweitzer danke ich für die Möglichkeit, am botanischen Institut der Universität Wien cytologische Methoden kennengelernt zu haben.

Dr. T. Jenuwein und S. Rea möchte ich für die Einweisung in proteinbiochemische Arbeiten am IMP in Wien danken.

Prof. Dr. P. Fransz danke ich für die Einarbeitung in die Immunocytologischen Methoden.

Der gesamten AG Entwicklungsgenetik danke ich für die Anregung, Unterstützung und Motivierung sowie das gute Arbeitsklima.

Meiner Familie und meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung meines Studiums und für die Unterstützung und der Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Die Arbeit wurde selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 01.06.2005

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Fischer
geboren: 20. Mai 1970 in Erfurt / Thüringen
Nationalität: deutsch
Zivilstand: verheiratet, 2 Kinder

1976 bis 1986 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „POS Albert-Schweizer“ Gotha / Thüringen, Mittlere Reife

1986 bis 1988 Erweiterten Oberschule „EOS-Arnoldii“, Gotha / Thüringen, Abitur

1988 bis 1990 Wehrdienst

1990 bis 1992 Studium der Landwirtschaft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1992 bis 1996 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1996 bis 1997 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: " Molekulargenetische Untersuchung heterochromatin-assoziiierter Proteine mit Hilfe des Hefe-Dihybridsystems und des Telomer-Positionseffektes in *Saccharomyces cerevisiae* "

seit 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den 01.06. 2005

Publikationen:

- Kiessig S, Reissmann J, Rascher C, Kullertz G, Fischer A, Thunecke F. Application of a green fluorescent fusion protein to study protein-protein interactions by electrophoretic methods. *Electrophoresis*. 2001 Apr;22(7):1428-35.
- Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K, Assalkhou R, Schulz I, Reuter G, Aalen RB. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res*. 2001 Nov 1;29(21):4319-33.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J*. 2002 Mar 1;21(5):1121-31.
- Naumann K., Fischer A., Hofmann I., Krauss V., Phalke S., Irmeler K., Hause G., Aurich A.-C., Dorn R., Jenuwein T., Reuter G. Pivotal role of AtSUVH2 in control of heterochromatic histone methylation marks and gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 2005, Mar 17
- Thorstensen, T., Fischer, A., Johnsen, S.S., Reuter G., Aalen, R.B. (2005). The *Arabidopsis* SUVH4 protein is a nucleolar histone H3 Lys9 methyltransferase containing a new plant specific protein domain. In Vorbereitung.