

4. Epigenetik in der Pflanzenzüchtung

4.1 Einleitung

Die Epigenetik beschreibt Änderungen der Genregulation bei Eukaryonten, die nicht auf genetische Mutationen zurückzuführen sind. Sie kann zu vererbaren phänotypischen Veränderungen (Epi-Mutanten) führen, die anders als genetische Veränderungen reversibel sind und mit DNA- sowie Chromatin-Modifikationen einhergehen. Damit bildet die Epigenetik eine Regulationsebene, die über (griechisch: *epí*) der durch die DNA-Basenabfolge bestimmten Genetik eines Organismus liegt.

In Pflanzen spielt die DNA-Methylierung bei der Initiation epigenetischer Mechanismen eine bedeutendere Rolle, als sie dies bei allen anderen Eukaryonten tut. Bei einigen Eukaryonten wie *Caenorhabditis elegans*¹ hat man die meisten bekannten Chromatin-Modifikationen, wie Histon-Methylierung, -Acetylierung und -Phosphorylierung, gefunden, konnte aber erst kürzlich DNA-Methylierung nachweisen, bei der es sich allerdings nicht um die Methylierung des Cytosins (C, C-Methylierung), sondern um die des Adenins (A, A-Methylierung) handelt. Darüber hinaus gibt es derzeit nur für Pflanzen eindeutige Hinweise dafür, dass Demethylierung oder De-novo-Methylierung Chromatin-Veränderungen einleitet. Obwohl auch in Pflanzen Chromatin-Strukturen die Etablierung von bestimmten Methylierungsmustern begünstigen, nimmt man beispielsweise für Säugetiere an, dass Chromatin-Modifikationen einer De-novo-DNA-Methylierung üblicherweise vorausgehen müssen. Generell gilt für Pflanzen, dass durch Veränderungen des Methylierungsmusters strukturelle Veränderungen des Chromatins bewirkt werden. Dabei führt die Hypermethylierung zu Chromatin-Kondensationen, woraus wiederum die Etablierung von transkriptionell inaktivem Hetero-

¹ Der einfach gebaute Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wird seit den 1970ern für die Untersuchung grundlegender genetischer und entwicklungsbiologischer Forschungsfragen herangezogen.

chromatin resultiert. Transkriptionell aktives Euchromatin findet man hingegen in Chromosomenabschnitten, in denen hypomethylierte DNA überwiegt.

Bestimmte Methylierungsmuster können in Pflanzen von Zelle zu Zelle und sogar von Generation zu Generation weitergegeben werden. Allerdings kann auch eine Fülle von Effekten, zu denen Umwelteinflüsse gehören, etablierte Methylierungsmuster stark verändern. Damit wird eine Vorhersage über die Vererbbarkeit epigenetisch bedingter Phänotypen sehr schwer. Heute weiß man, dass epigenetische Genregulationen Schlüsselfunktionen bei biotischen/abiotischen Stressreaktionen, der Vernalisation, der transienten Vererbung zahlreicher Eigenschaften, der Heterosis und bei der Genomstabilität, einschließlich der Suppression von Transposon-Aktivitäten, haben. Darüber hinaus kann heute mit verschiedenen Techniken das Epigenom der Pflanze manipuliert werden, was neue Wege für die Pflanzenzüchtung eröffnet.

Interessanterweise können epigenetische Vorgänge durch RNA-Moleküle gesteuert werden. Die Mechanismen dieser RNA-vermittelten Epigenetik wurden zuerst in der Pflanze entdeckt und dort auch genauer untersucht. Auch wenn viele Prozesse weitgehend aufgeklärt wurden, so bedürfen einige Abläufe noch weiteren umfassenden Analysen, um die komplexen Wechselwirkungen zwischen RNA, DNA, DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen verstehen zu können. In diesem Übersichtsartikel soll unser derzeitiger Wissensstand über die Epigenetik der Pflanzen zusammengefasst, noch offene Fragen diskutiert, Parallelen und Divergenzen zwischen pflanzlichen und nicht pflanzlichen Organismen aufgezeigt und innovative Ansätze beschrieben werden, die Modifikationen des pflanzlichen Epigenoms als Methode zur Züchtung von Pflanzen beinhalten.

4.2 DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen

In eukaryontischen Organismen umfasst die DNA-Methylierung nahezu ausschließlich die Modifizierung der Cytosine (C-Methylierung).² Bei der C-Methylierung dient den DNA-Methyltransferasen genomicische DNA als Substrat. Durch Ankopplung einer Methylgruppe an das fünfte Kohlenstoffatom (C5) des Cytosins entsteht letztendlich 5-Methylcytosin (5mC). Für die Mechanismen der DNA-Methylierung sind – bei vielen

² Allerdings wurden kürzlich Arbeiten veröffentlicht, die darauf hinweisen, dass wie in Prokaryonten auch in Eukaryonten N6-Methyladenin (6mA) vorkommt (Greer et al., 2015; Fu et al., 2015; Zhang et al., 2015). Die Methylgruppe wird hier anstatt an die Cytosine an die Adenine der DNA gekoppelt. Auch in der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wurden sehr geringe Mengen 6mA gefunden (Ashapkin et al., 2002). Da aber für Pflanzen keine weiteren Daten vorliegen und die biologische Bedeutung des 6mAs in Pflanzen nicht klar ist, wird hier nur auf die C-Methylierung eingegangen.

grundlegenden Gemeinsamkeiten – charakteristische Unterschiede zwischen Pflanzen und Säugetieren hervorzuheben, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Im Gegensatz zu den Pflanzen kann 5-Methylcytosin in Säugetieren in 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) umgewandelt werden (Erdmann et al., 2014). Diese Umwandlung scheint überwiegend einen Zwischenschritt während der aktiven DNA-Demethylierung bei Säugetieren darzustellen (Xu/Walsh, 2014). Bei Pflanzen erfolgt die aktive DNA-Demethylierung durch einen direkten enzymatischen Stoffwechselweg, der durch die Glykosylasen ROS1 („repressor of silencing 1“) und DME („demeter“) katalysiert wird (Zhang/Zhu, 2012).

Findet man in fast allen somatischen Säugerzellen das 5-Methylcytosin (5mC) nur in CG-Dinukleotiden,³ so kann es in Pflanzenzellen in allen Sequenzkontexten nachgewiesen werden. Wegen der Symmetrie von CG-Dinukleotiden innerhalb eines DNA-Doppelstrangs spricht man hier von symmetrischer DNA-Methylierung und setzt diese der asymmetrischen DNA-Methylierung gegenüber, die 5mC-Positionen umfasst, die nicht im CG-Kontext (z. B. CHH; H = Adenin, Cytosin oder Thymin) vorliegen (siehe Abbildung 1). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass kürzlich auch in embryonalen Stammzellen, Eizellen und selbst in bestimmten somatischen Zellen von Säugern asymmetrische DNA-Methylierung gefunden wurde (Lister et al., 2009; Shirane et al., 2013; Pinney et al., 2014).

Wurden Methylierungsmuster durch De-novo-DNA-Methylierungsmechanismen einmal etabliert, so bleiben sie im Falle der symmetrischen CG-Methylierung in somatischen Zellen grundsätzlich erhalten. Bei der DNA-Replikation werden Cytosine in neu synthetisierten, nicht methylierten DNA-Strängen an CG-Positionen methyliert, wenn der Matrizenstrang an der entsprechenden Stelle methyliert vorlag. In Pflanzen übernimmt diese Aufgabe die DNA-Methyltransferase MET1, ein Homolog der DNMT1⁴ der Säugetiere. Asymmetrische Methylierungsmuster, die durch die DRMs („domains rearranged methyltransferases“), Homologe der DNMT3a der Säugetiere, katalysiert werden, gehen hingegen in der Regel bei der DNA-Replikation verloren (Cao et al., 2003).

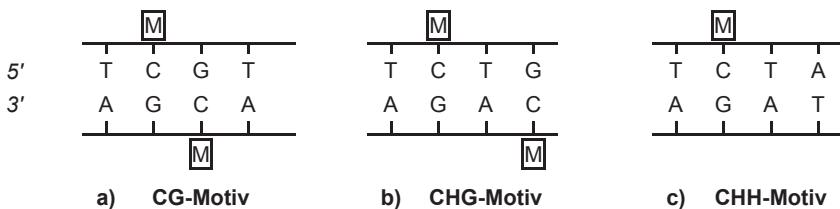
Ein Sonderfall für die Erhaltung asymmetrischer Methylierung wird allerdings von den pflanzenspezifischen Chromomethyltransferasen CMT2 und CMT3 katalysiert. Liegen bestimmte Chromatin-Modifikationen, vornehmlich die Di-Methylierung

³ Ein CG-Dinukleotid beschreibt die Abfolge von einem Cytosin (C) direkt gefolgt von einem Guanin (G) in der Sequenzabfolge des DNA-Strangs in 5'→3'-Richtung.

⁴ DNMTs = DNA-Methyltransferasen. Gruppe von Enzymen in Säugetieren. Bei der De-novo-Methylierung fügen DNMT3a und DNMT3b Methylgruppen an unmethylierte DNA an. Bei der DNA-Replikation erkennt die DNMT1 hemi-methylierte DNA und ergänzt Methylgruppen am neu synthetisierten Strang.

des Lysins 9 des Histons H3 (H3K9me2),⁵ vor, so können von der CMT2 die CHH- und die CHG-Methylierung erhalten werden, während von der CMT3 nur die CHG-Methylierung weitergegeben werden kann (Ebbs/Bender, 2006; Stroud et al., 2014). Eine Voraussetzung für die Erhaltung von asymmetrischer Methylierung ist natürlich, dass die entsprechenden Positionen zuvor durch De-novo-Methylierungsprozesse modifiziert wurden.

Abbildung 1: Cytosin-Methylierung in Pflanzen



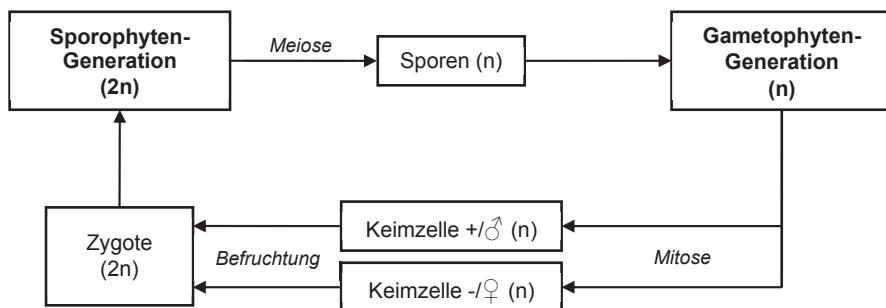
a) symmetrische CG-Methylierung, b) CHG-Methylierung (H = A, T, C), c) asymmetrische CHH-Methylierung (H = A, T, C), \boxed{M} = Methylgruppe.

Die epigenetische Reprogrammierung beim Generationswechsel (siehe Abb. 2) ist weitaus komplizierter als in somatischen Zellen und unterscheidet sich deutlich zwischen Säugetieren und Pflanzen (Kawashima/Berger, 2014). In Säugetieren finden zwei umfassende DNA-Demethylierungs- und DNA-Remethylierungsphasen in den Keimzellen sowie im Embryo während seiner frühen Entwicklung statt. In Pflanzen ist die epigenetische Reprogrammierung überaus komplex und kann deshalb hier nur kurz angerissen werden. Dies mag daran liegen, dass in Pflanzen ein ausgeprägter RNA-dirigierter DNA-Methylierungsmechanismus existiert, der einen Zell-zu-Zell-Transportprozess von RNA-Molekülen einbezieht (siehe Abschnitt 4.3). Darüber hinaus sind in Pflanzen die einzelnen Phasen der DNA-Demethylierung und DNA-Remethylierung während der Entwicklung der Keimzellen noch nicht sehr gut untersucht. So fehlen beispielsweise noch jegliche genomweite DNA-Methylierungsprofile von weiblichen und männlichen Meiozyten, deren Vorläuferzellen sowie von Eizellen. Man weiß jedoch, dass auch in Pflanzen DNA-Demethylierungsprozesse während der Keimzellenentwicklung stattfinden, wie vornehmlich durch Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* belegt

5 Methylierungen können an Lysin- und auch an Argininresten der unterschiedlichen Histone (H1-H5) des Chromatins stattfinden. Der Effekt auf die Genexpression hängt von der Position der Lysinreste in den Histonen und vom Grad der Methylierung (einfach, zweifach, dreifach methyliert) ab.

wurde. Allerdings behalten viele Transposons sowie einige Strukturgene ihre Methylierung bei.

Abbildung 2: Lebenszyklus der Pflanzen (schematisch)



Für Pflanzen ist ein sogenannter Generationswechsel typisch: haploide (n) und diploide (2n) Generationen wechseln einander ab. Zwei haploide Keimzellen verschmelzen bei der Befruchtung zur diploiden Zygote. Aus dieser wächst die Sporophyten-Generation (2n), welche haploide Sporen bildet. Die Reduktion des Chromosomensatzes in den Sporen erfolgt durch die Meiose. Aus den Sporen entwickelt sich die Gametophyten-Generation (n), welche haploide Keimzellen mitotisch bildet.

Ausgewählte Fachbegriffe:

Samenpflanzen (Spermatophyten): beherrschende Gruppe der heutigen Landpflanzen, die zu ihrer Verbreitung Samen ausbilden. Phylogenetisch unterschieden werden die Palmfarne, der Ginkgo, die Nadelhölzer bzw. Nacktsamer (Gymnosperme) und – als größte bedeutendste Gruppe – die Blütenpflanzen bzw. Bedecktsamer (Angiosperme). Von den Samenpflanzen abzugrenzen sind die einfacher gebauten Moose und Farne, die sich vor allem über Sporen verbreiten.

Generationswechsel: Wechsel von haploider Generationsphase (**Gametophyt**), die Sporen durch Meiose produziert, und diploider Generationsphase (**Sporophyt**), die Keimzellen durch mitotische Teilungen produziert, im pflanzlichen Lebenszyklus. Beide Generationen können sich morphologisch gleichen (z. B. bei einigen Algen), aber sind typischerweise unterschiedlich. Bei den Moosen ist Gametophyt die dominante Generation und der Sporophyt nur eine sehr kurze Phase. Bei Farnen und den Samenpflanzen ist umgekehrt der Sporophyt die dominante Generation (also das, was allgemein als „Farn“ oder „Pflanze“ in der Natur wahrgenommen wird). Bei den Samenpflanzen entwickeln sich die Gametophyten nur noch in stark reduzierter „versteckter“ Form in den Blütenorganen der Sporophyten.

Keimzellen (Gameten): haploide Zellen, die für die geschlechtliche Fortpflanzung über einen mehrstufigen Entwicklungsprozess gebildet werden. Weibliche Keimzellen = **Eizellen**, männliche Keimzellen = **Spermatozoide** (beweglich) oder **Spermazellen** (unbeweglich). Verschmelzen zwei Keimzellen des jeweils anderen Geschlechts bei der Befruchtung zur diploiden Zygote, kann sich daraus ein neuer (diploider) Organismus entwickeln.

Sporen: haploide Zellen, aus denen sich jeweils ein neuer (haploider) Organismus entwickeln kann. Sporen können gleich gestaltet sein (isospor) oder unterschiedliche Größen haben. Bei den Samenpflanzen und einigen Farnen entwickelt sich aus der kleineren **Mikrospore** der männliche Gametophyt und aus der größeren **Megaspore** der weibliche Gametophyt.

Samenanlage: In der Blüte der Samenpflanzen befindet sich die Samenanlage – in dieser entwickelt sich ein stark reduzierter **weiblicher Gametophyt (Embryosack)**, der neben der eigentlichen **Eizelle** weitere, den Befruchtungsvorgang unterstützende Zellen enthält. Bei den Nacktsamern ist die Samenanlage für den Pollen frei zugänglich, bei den Bedecktsamern in spezialisierte Gewebe (Fruchtblattgewebe) eingehüllt („bedeckt“).

Pollen(körper): Mikrosporen, die in den Blüten der Samenpflanzen gebildet werden. Diese werden zur Bestäubung zur weiblichen Samenanlage getragen (z. B. durch Wind oder Insekten). Die eigentliche Befruchtung beginnt mit der Pollenkeimung, bei der sich im Pollenkorn ein stark reduzierter **männlicher Gametophyt (mehrkerniges Pollenkorn)** bildet. Bei den Bedecktsamern besteht er nur noch aus zwei Zellen: einer **vegetativen Zelle**, die den Pollenschlauch bildet, und einer **generativen Zelle**, aus der sich zwei Spermazellen bilden. Zur Befruchtung wächst der Pollenschlauch aus dem Pollenkorn aus durch die weiblichen Blütenorgane hindurch, um die beiden Spermazellen(kerne) in die weibliche Samenanlage zu leiten.

Doppelte Befruchtung bei Bedecktsamern: Typischerweise verschmilzt bei den Angiospermen eine der beiden Spermazellen, die aus dem Pollenkorn in den weiblichen Embryosack entlassen werden, mit der Eizelle zur **Zygote**. Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich der pflanzliche **Embryo**. Die zweite Spermazelle dringt in die große **zentrale Zelle des Embryosacks** ein und verschmilzt mit deren Zellkern (dem sog. sekundären Embryosackkern): Aus dieser zweiten („doppelten“) Befruchtung geht das **Endosperm** als Nährgewebe für den Embryo hervor. Die umhüllende Samenanlage entwickelt sich weiter zum **Samen**, welcher der Verbreitung und der späteren Weiterentwicklung des im Samen ruhenden Embryos (junger Sporophyt) dient.

Bei der Bildung der männlichen Keimzellen (Spermatogenese) bleibt im Vergleich zu den Mikrosporen (bei Samenpflanzen: Sporen) die symmetrische CG-Methylierung in den Spermazellen nahezu konstant. Die asymmetrische CHH-Methylierung nimmt hingegen ab. Demgegenüber verringert sich die CG-Methylierung in den vegetativen Zellen des Pollens, während die CHH-Methylierung zunimmt.

In Ermangelung an DNA-Methylierungsprofilen gibt es für die epigenetische Reprogrammierung der weiblichen Keimzellen, der Eizellen, nur indirekte Hinweise für DNA-Demethylierungsprozesse, die auf Expressionsstudien von Transposons und DNA-Methyltransferasen beruhen. In der Eizelle werden Methyltransferasen MET1, CMT2 und CMT3, die die CG- und CHG-Methylierung erhalten, kaum exprimiert, sodass man eigentlich einen deutlichen Rückgang der DNA-Methylierung erwarten könnte. Ein solcher Verlust von Methylierung (Hypomethylierung) wird tatsächlich aber nicht gefunden. Diese Beobachtung mag daraus resultieren, dass die Glykosylase DME – die DNA-Methylierungen aktiv entfernt – nicht exprimiert wird, dafür aber die beiden Methyltransferasen DRM1 und DRM2. Die Expression der DRM-Gene weist darauf hin, dass in der Eizelle De-novo-Methylierung durch die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM, siehe Abschnitt 4.3) vermittelt wird. Das heißt, die indirekten Hinweise für DNA-Demethylierungsprozesse in der Eizelle sind irreführend.

Wie in männlichen Meiozyten werden auch in den weiblichen Meiozyten Transposons exprimiert, die in somatischen Zellen inaktiv sind. In der zentralen Zelle des weiblichen Gametophyten gehen sowohl die symmetrische als auch die asymmetrische Methylierung zurück, was wohl daran liegt, dass in der zentralen Zelle die Expression der MET1 reprimiert und die der DME-Gene hochreguliert wird. Letztendlich scheinen in der zentralen Zelle alle Gene transkriptionell aktiviert zu werden, die unter der Kontrolle methylierter Promotoren stehen. Diese Aktivierung betrifft nicht nur Transposons, sondern auch sogenannte regulatorische *cis*-Elemente⁶, die die Expression genomisch geprägter Gene („imprinted genes“) kontrollieren. Das Imprinting beschreibt einen Mechanismus der Genregulation, bei dem selektiv entweder nur die mütterliche oder die väterliche Genkopie im Genom exprimiert wird. Eine große Anzahl der „imprinted genes“ wird im Endosperm exprimiert. Den Archetyp eines genomisch geprägten Gens stellt das *FWA*-Gen⁷ in *A. thaliana* dar, das aufgrund der CG-Methylierung seines Genpromotors in somatischen Zellen inaktiv ist. In der zentralen Zelle des weiblichen Gametophyten wird die Promotor-Methylierung jedoch entfernt, wodurch das *FWA*-Gen aktiviert wird. Im Gegensatz dazu bleibt die Methylierung des *FWA*-Genpromotors in der männlichen Keimzelle erhalten. Nach der Befruchtung gibt dann das Endosperm ein inaktiviertes, methyliertes väterliches Allel und ein aktives, nicht methyliertes weibliches Allel weiter. Wie dem auch sei, die biologische Bedeutung der Demethylierung in der zentralen Zelle ist bis heute nicht geklärt.

⁶ *Cis*-Elemente sind charakteristische, kurze DNA-Abschnitte, die die Expression von Genen beeinflussen. Sie befinden sich auf dem gleichen Chromosom wie das Gen, an dessen Regulation sie beteiligt sind.

⁷ *FWA* = „flowering wageningen“. Das Gen codiert das „homeobox-leucine zipper protein HDG6“.

Die epigenetische Reprogrammierung während der frühen Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung der Eizelle. Die Expression von Genen, die an symmetrischen und asymmetrischen Methylierungsprozessen beteiligt sind, werden und bleiben bis zur späten Embryogenese hochreguliert. Die Gesamtmethylierung des Genoms nimmt stetig zu, und die endgültigen Methylierungsmuster der somatischen Zellen werden bereits in diesem Zeitrahmen etabliert.

In Anbetracht dessen, dass während der sexuellen Vermehrung von Pflanzen umfassende DNA-Demethylierungs- und Methylierungsprozesse stattfinden, ist es bis heute noch völlig unklar, wie Methylierungsmuster von Generation zu Generation weitergegeben werden können. Es wird angenommen, dass die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (siehe Abschnitt 4.3) eine essenzielle Rolle bei der generationenübergreifenden Vererbung von Methylierungsmustern spielt (Teixeira et al., 2009). Für diesen Fall muss man aber annehmen, dass die Moleküle präsent sind, die eine De-novo-Methylierung der DNA auslösen, und dass zudem neben der symmetrischen CG-Methylierung auch asymmetrische DNA-Methylierung innerhalb der entsprechenden DNA-Sequenzen zu finden sein müsste (siehe unten). Demgegenüber konnte aber gezeigt werden, dass CG-Methylierung eines Transgen-Promotors sowie einer codierenden Region eines Transgens auch in Abwesenheit der entsprechenden RdDM-Auslösermoleküle über mehrere Generationen weitergegeben wurde (Jones et al., 2001; Dalakouras et al., 2012). Diese Daten zeigen, dass die Demethylierung während der sexuellen Reproduktion offensichtlich nicht vollständig sein kann, denn ohne RdDM-Auslösermoleküle ist eine De-novo-Methylierung und darüber hinaus eine De-novo-Methylierung von ausschließlich CG-Sequenzen nicht zu erwarten. Welche endogene Sequenzen demethyliert und via RdDM wieder remethyliert werden und welche endogenen Sequenzen auf welche Weise einer Demethylierung entkommen, ist nicht bekannt.

4.3 RNA-dirigierte DNA-Methylierung

Da die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM) bisher nur in Pflanzen eindeutig nachgewiesen wurde, soll dieser Mechanismus der De-novo-DNA-Methylierung hier im Detail beschrieben werden.

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz („RNA interference“, RNAi) im Jahre 1998 – die US-amerikanischen Forscher Fire und Mello (Fire et al., 1998) zeigten, dass doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) die Expression von Genen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* unterdrücken können – wurden bedeutsame Fortschritte bei der Aufklärung epigenetischer Phänomene erzielt, die durch nicht codierende RNA („non-coding RNA“, ncRNA) vermittelt werden. Zu diesen Phänomenen zählen unter anderem die transkrip-

tionelle Gen-Inaktivierung und die Umgestaltung von Chromatin-Strukturen („chromatin remodelling“). In fast allen eukaryontischen Organismen scheinen ncRNAs zumindest für einige chromosomale Regionen eine große Bedeutung bei der Bildung und dem Erhalt heterochromatischer Strukturen zu besitzen. Für Pflanzen konnte bereits 1994 gezeigt werden, dass De-novo-Methylierung hochspezifisch durch dsRNA zu homologen DNA-Abschnitten dirigiert werden kann (Wassenegger et al., 1994).

Die Herkunft von dsRNA ist sehr vielseitig. Sie kann aus exogenen Quellen stammen (z. B. von Viren und Bakterien), aber auch aus endogenen (z. B. via Transkription sogenannter Haarnadelstrukturen und aberranter RNA-Moleküle).⁸ Darauf hinaus wird angenommen, dass dsRNA durch die gemeinsame Aktivität der pflanzenspezifischen DNA-abhängigen RNA-Polymerase IV (Pol IV) und der RNA-dirigierten RNA-Polymerase 2 (RDR2) generiert wird (siehe Abbildung 3; „Pol IV-dependent siRNA biogenesis“). DsRNA, die auf diese Weise hergestellt wird, ist aber eher nicht an einer „echten“ De-novo-DNA-Methylierung beteiligt, da die Pol IV über eine Interaktion mit dem Protein „Sawadie Homeodomain Homologue 1“ (SHH1) zu ihrem Transkriptionsort geführt wird. SHH1 selbst bindet an das Lysin 9-dimethylierte Histon 3 (H3K9me2), dessen Methylierung methylierte DNA voraussetzt. Das heißt, es muss bereits DNA-Methylierung vorliegen, bevor Pol IV zusammen mit RDR2 dsRNA generieren kann. Es ist wahrscheinlich, dass die über die Pol IV und RDR2 vermittelte Biosynthese dsRNA einer Verstärkung und/oder Beschleunigung der RNA-dirigierten DNA-Methylierung dient.

Ob dsRNA die De-novo-Methylierungsmaschinerie direkt an homologe DNA-Sequenzen führen kann oder ob sie zunächst prozessiert werden muss, wird derzeit kontrovers diskutiert (Dalakouras/Wassenegger, 2013). Gemäß den bisher veröffentlichten RdDM-Modellen wird die dsRNA von der „DICER-Like 3“-Nuklease (DCL3) in kleine Fragmente zerschnitten: Es entstehen kurze (24 Nukleotide) dsRNAs, die sogenannten „small interfering RNAs“ (24-nt siRNAs) (siehe Abb. 3; „Pol V-mediated de novo methylation“). Anschließend werden die siRNAs vornehmlich auf das Argonaut-4-Protein (AGO4) geladen und aufgespalten: Nach Abspaltung des sogenannten „passenger strands“ verbleibt der „guide strand“ an AGO4 und kann an komplementäre RNA-Moleküle binden.

Nach den derzeit wissenschaftlich anerkannten RdDM-Modellen wird die komplementäre RNA von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase V (Pol V) generiert. Es sei hier aber darauf hingewiesen, dass die Pol V präferenziell methylierte DNA transkribiert, was im Widerspruch zu ihrer Funktion als Hauptakteur bei der De-novo-DNA-Methy-

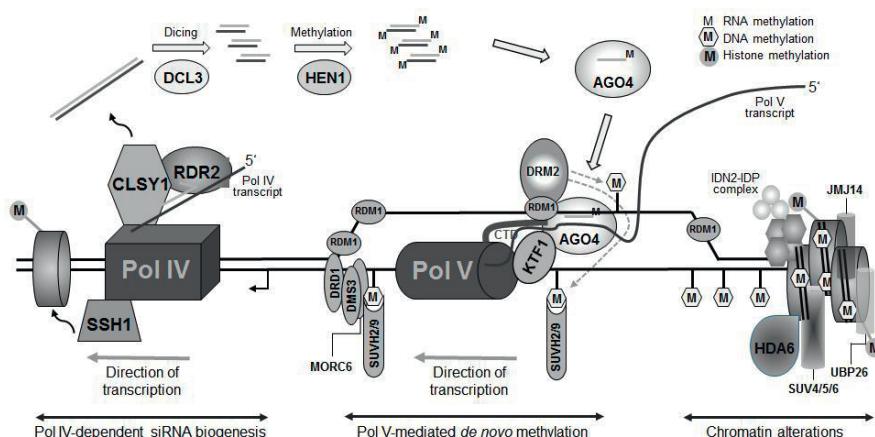
⁸ Aberrante RNA-Moleküle sind vermutlich mRNA-Moleküle, die keine CAP und/oder keinen Poly-(A)-Schwanz besitzen. Akkumulieren diese RNAs über einen Schwellenwert hinaus, so werden sie von der RNA-dirigierten RNA Polymerase 6 (RDR6) transkribiert, und es entsteht eine dsRNAs.

lierung steht. Es ist nicht plausibel, dass ein Enzym an der De-novo-DNA-Methylierung beteiligt ist, dessen Aktivität von methylierter DNA abhängig ist. Wie dem auch sei, sobald der 24-nt siRNA/AGO4-Komplex an die komplementäre Ziel-RNA gebunden hat, entsteht über das Brückenprotein, „KOW domain-containing Transcription Factor 1“ (KTF1), eine Komplexbildung mit der Pol V. Dieser Komplex soll dann letztendlich mithilfe des „RNA-directed DNA methylation 1“-Proteins (RDM1) die Rekrutierung der Methyltransferase DRM2 zu dem DNA-Abschnitt initiieren, von dem das Pol V-Transkript abgeschrieben wurde.

Neben den oben genannten wurden noch weitere Enzyme gefunden, deren Aktivität für die RNA-dirigierte DNA-Methylierung essenziell ist. Durch die Charakterisierung von *A. thaliana*-Mutanten konnten Proteine wie das „Defective in RNA-directed DNA methylation 1“ (DRD1), das eine Aktivität zum Entwinden von dsDNA besitzt, identifiziert werden. Das Protein RDM1, das Einzelstrang-DNA bindet, und die vermeintliche „cohesin-like“-Funktion des „Defective in Meristem Silencing 3“-Proteins (DMS3) tragen vermutlich dazu bei, in Zusammenwirkung mit dem Microrchidia 6-Protein (MORC6), die entwundene DNA zu stabilisieren. Chromatin-Modifikationen, die nicht zwingend die Folge einer De-novo-DNA-Methylierung sein müssen (Dalakouras et al., 2012), werden dann letztendlich durch Nukleosom-Verschiebungen eingeleitet, die vom SWI/SNF-Komplex⁹ der mit dem „Involved in De Novo 2“ (IDN2)-IDP-Komplex (einem IDM2 Paralog) interagiert, initiiert werden. Nach der Methylierung des H3K9 durch die Histon-Methylasen „Suppressor of Variegation 4“ (SUVH4), SUVH5 und SUVH6 werden die typischen Marker für aktives Chromatin durch die Histon-Deacetylase 6 (HDA6), das Jumonji 14-Protein (JM14) und die Ubiquitin-spezifische Protease 26 (UBP26) entfernt.

⁹ SWI/SNF-Komplexe (auch SWI/SNF-ATPasen) sind Multiprotein-Komplexe, die enzymatisch die Anordnung der Nukleosomen im Chromatin verändern („remodellieren“).

Abbildung 3: Schematische Darstellung des derzeit anerkannten Modells der RNA-dirigierten DNA-Methylierung



Die einzelnen Prozesse sind im Abschnitt 4.3 detailliert beschrieben. Die Abbildung wurde der Arbeit von Matzke und Mosher (2014) entnommen und leicht vereinfacht nachgezeichnet. Erläuterungen der einzelnen Komponenten siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Komponenten der RNA-dirigierten DNA-Methylierung

Abk.	Protein	Funktion
1. Synthese von kurzen interferierenden RNAs (Pol IV-dependent siRNA biosynthesis)		
CLSY1	SNF2 domain-containing protein CLASSY 1	vermeintliches SWI/SNF „chromatin remodeler“-Protein
DCL3	endoribonuclease Dicer homolog 3	Dicer-Endonuklease, die 24-nt siRNAs aus längeren dsRNAs generiert
HEN1	protein HUA enhancer	RNA-Methyltransferase
Pol IV	DNA-dependent RNA polymerase	
RDR2	RNA-directed RNA polymerase 2	
SHH1	protein SAWADEE homeodomain homolog 1	bindet methyliertes H3K9 und rekrutiert Pol IV
2. Setzung neuer DNA-Methylierungsmuster (Pol V-mediated de novo methylation)		
AGO4	protein argonaute 4	
DMS3	protein defective in meristem silencing 3	SMC solo hinge Protein, vermeintliche „cohesin-like“-Funktion
DRD1	protein defective in RNA-directed DNA methylation 1	vermeintliches SWI/SNF „chromatin remodeler“-Protein, entwindet dsDNA
DRM2	protein domains rearranged methylase 2	De-novo-DNA-Methyltransferase
KTF1	KOW domain-containing transcription factor 1	enthält ein AGO4 Adapter-Motiv
MORC6	protein microrchidia 6	ATPase
Pol V	DNA-dependent RNA polymerase V	
RDM1	protein RNA-directed DNA methylation 1	bindet ssDNA
SUVH2/9	SRA domain protein 2/9	binden an methylierte DNA und rekrutieren Pol V
3. Modifikationen der Histone (Chromatin alterations)		
HDA6	histone deacetylase 6	
IDN2	protein involved in de novo 2	dsRNA-bindendes Protein
IDP	protein IDN2 paralog	
JMJ14	protein Jumonji14	Histon-Demethylase
RDM1	protein RNA-directed DNA methylation 1	interagiert mit AGO4 und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II
SUVH4/5/6	suppressor of variegation 3-9 homolog protein 4/5/6	H3K9 Methyltransferasen
UBP26	ubiquitin-specific-processing protease 26	Histon H2B Deubiquitinase

4.4 Epigenetische Variationen und deren umweltbedingte Änderungen

Umwelteinflüsse können die Regulation pflanzlicher Gene in erheblichem Maße beeinflussen. Eine Schlüsselrolle spielen dabei epigenetische Effekte, diese können sowohl somatische (nur das Individuum betreffende) als auch transgenerationale (auf die Nachkommen übertragene) Auswirkungen auf die Genexpression haben (Meyer, 2015). Änderungen von DNA- und Histon-Methylierungsmustern nehmen Einfluss auf zahlreiche genregulatorische Prozesse wie:

- ▶ die Genexpression (Huettel et al., 2006),
- ▶ das Transkriptslicing (Regulski et al., 2013),
- ▶ die Polyadenylierung von mRNA (Tsuchiya/Eulgem, 2013),
- ▶ die Reparatur von DNA (Yao et al., 2012) und
- ▶ die homologe Rekombination (Mirouze et al., 2012; Melamed-Bessudo/Levy, 2012).

Diese Vielfältigkeit gestaltet die Zuordnung von direkten und indirekten Auswirkungen epigenetischer Effekte sehr schwierig. Es gibt zahlreiche Arbeiten, die eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und der Ausprägung spezifischer Phänotypen beschreiben, aber nur wenige, die auf eine direkte Transkriptionsinhibierung durch DNA-Methylierung hinweisen. Beispiele, die einen direkten Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und phänotypischen Veränderungen nahelegen, umfassen:

- ▶ die „elterliche Prägung“ (Imprinting) (Huh et al., 2008),
- ▶ die Blütenentwicklung (Cubas et al., 1999),
- ▶ den Blühzeitpunkt (Soppe et al., 2000),
- ▶ die Pigmentierung von Maiskörnern (Stam et al., 2002),
- ▶ die Fruchtreifung (Manning et al., 2006),
- ▶ die Geschlechtsbestimmung (Martin et al., 2009) und
- ▶ die Entwicklung von Stomata¹⁰ (Tricker et al., 2012; Yamamoto et al., 2014).

Zu den vererbaren epigenetischen Eigenschaften zählen Veränderungen von Methylierungsmustern einiger Gene, die die Samenbildung regulieren (Hauben et al., 2009). Die Charakterisierung der Nachkommen genetischer Kreuzungen zwischen epigene-

¹⁰ Stomata sind regulierbare spaltförmige Öffnungen in der pflanzlichen Epidermis, sie dienen Pflanzen zur kontrollierten (stomatären) Transpiration und zum kontrollierten Gasstoffwechsel mit der Umgebung.

tischen *A.-thaliana*-Mutanten, deren Eltern differenziell methylierte DNA-Regionen (DMRs)¹¹ besaßen, weist darauf hin, dass die Anzahl an vererbaren epigenetischen Eigenschaften wesentlich größer sein könnte als bisher angenommen (Cortijo et al., 2014).

Es ist schwierig, Umwelteinflüsse Reaktionen der Pflanze zuzuordnen, die unmittelbar auf epigenetischen Genregulationen basieren. Häufig werden für solche Untersuchungen Mutanten herangezogen, die einen Defekt in DNA-Methylierungs- oder Chromatin-Modifikationsprozessen aufweisen. Untersuchungen von *A.-thaliana*-Linien, bei denen die DNA-Methyltransferase MET1 inaktiviert wurde, zeigten beispielsweise zahlreiche verschiedene Phänotypen, die wohl darauf zurückzuführen waren, dass als direkte Folge des Verlusts der MET1-Aktivität die Expression von DNA-Demethylasen supprimiert wurde (Mathieu et al., 2007). Dadurch wiederum erfolgte eine indirekte DNA- und Histon-Hypermethylierung, die letztendlich zu zufälligen Genexpressionsveränderungen und den beobachteten Phänotypen führte. Dennoch konnte klar gezeigt werden, dass Umwelteinflüsse wie biotischer/abiotischer Stress direkte und spezifische Effekte auf die Epigenetik der Pflanze haben können. So wurden durch genomweite DNA-Methylom-Analysen von *A. thaliana*, die mit dem phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* infiziert oder mit Salizylsäure (einem Signalmolekül in der Pathogenabwehr) behandelt wurden, viele stressinduzierte differenziell methylierte DNA-Regionen nachgewiesen (Dowen et al., 2012). Gene innerhalb dieser DMRs zeigten häufig veränderte Expressionsmuster. Interessanterweise entwickelten Pflanzenlinien mit mutierten DNA-Methylasen eine erhöhte Resistenz gegen Infektionen mit *P. syringae*. In Übereinstimmung damit war der Befund, dass die veränderten Methylierungsmuster der DMRs mit einer Aktivierung von pathogenresponsive Genen korrelierten.

In der Literatur finden sich allerdings nur wenige Arbeiten, die eine Vererbung stressinduzierter epigenetischer Effekte an die nächsten Generationen beschreiben. In fast allen Fällen werden die epigenetischen Veränderungen in ihren Ursprungszustand zurückverwandelt, nachdem die Stresssituation aufgehoben wurde. Selbst in den Fällen, in denen eine transgenerationale Weitergabe beobachtet wurde, fehlen bisher eindeutige Nachweise dafür, dass die Weitergabe der epigenetischen Marker im direkten Zusammenhang mit der Etablierung von Stresstoleranzen steht (Kou et al., 2011; Zheng et al., 2013). In Bezug auf mögliche innovative Züchtungsverfahren, die auf stressinduzierten epigenetischen Veränderungen basieren, wäre es aber gerade wünschenswert, dass spezifische Stressreaktionen der Pflanze vererbt werden (siehe Kapitel 4.5.3).

¹¹ Die Unterscheidung von genetisch und epigenetisch vererbten Eigenschaften wird u. a. mithilfe spezieller Zuchtlinien untersucht, die sich nur in ihren Methylierungsmustern, aber (fast) nicht in ihrer DNA-Sequenz unterscheiden.

4.5 Entwicklung Epigenetik-basierter Züchtungsverfahren für Pflanzen

Für die Entwicklung neuer Verfahren in der Pflanzenzüchtung können grundsätzlich drei Epigenetik-basierte Ansätze verfolgt werden. Zwei Ansätze greifen indirekt auf epigenetische Variationen zurück, während ein Verfahren auf einer direkten Nutzung epigenetischer Veränderungen basiert. Als eine der wichtigsten Voraussetzungen für alle Epigenetik-basierten Verfahren gilt es zunächst zu entschlüsseln, welche Gene überhaupt epigenetisch reguliert werden.

4.5.1 Charakterisierung epigenetischer Regulationsphänomene

Eine grobe und globale Übersicht kann durch die Charakterisierung von Mutanten erzielt werden, die einen Defekt in Prozessen der DNA-Methylierung oder der Chromatin-Modifikation aufweisen (siehe Kapitel 4.4). Zudem können chemische Substanzen eingesetzt werden, die die DNA-Methylierung (z. B. durch Zebularine, vgl. Baubec et al., 2009) oder die Bildung von kondensierten Chromatin-Strukturen (z. B. durch Trichostatin A, vgl. Finnin et al., 1999) inhibieren. Durch derartige Chemikalien werden Gene aktiviert, die in unbehandelten Pflanzen epigenetisch stummgeschaltet vorliegen. Werden Zebularine und TSA zusammen eingesetzt, findet man einen synergistischen Effekt (Baubec et al., 2009), was darauf hindeutet, dass DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen teilweise unabhängig voneinander auf die Regulation von Genen einwirken können.

Um Unterschiede in der Genregulation aufgrund veränderter Methylierungsmuster oder veränderter Chromatin-Strukturen zu identifizieren, können zum einen die Mutanten und die chemisch behandelten Pflanzen selbst untersucht werden. Zum anderen stellen ihre Nachkommen weitere Ressourcen für Expressionsstudien dar: Es werden die Nachkommen aus Kreuzungen der Mutanten mit Wildtyp-Pflanzen und Nachkommen aus Selbstungen¹² der Mutanten sowie der behandelten Pflanzen charakterisiert. In den Nachkommen von Kreuzungen der Mutanten mit Wildtyp-Pflanzen und in denen der behandelten Pflanzen sind die Einwirkungen auf die natürlichen epigenetischen Prozesse nicht mehr vorhanden und viele der induzierten epigenetischen Veränderungen werden wieder in ihren Ursprungsstatus zurückgesetzt (Pecinka et al., 2010; Tittel-Elmer et al., 2010). Dennoch können einige der Nachkommen verschiedenste phänotypische Variationen aufweisen (Amoah et al., 2012; Cortijo et al., 2014). Diese

¹² Blütenpflanzen haben mehrheitlich zwittrige Blüten, eine Pflanze kann so mit sich selbst kreuzen (Selbstung). Es entfällt bei dieser Form der geschlechtlichen Fortpflanzung die Möglichkeit genetischer Rekombination mit einem anderen Individuum der jeweiligen Art.

wie auch alle anderen Ergebnisse, die mithilfe der oben genannten Techniken erzielt werden, sollten aber mit Vorsicht interpretiert werden. Wie bereits angedeutet, können allgemeine epigenetische Veränderungen sekundäre Effekte auslösen. In erster Linie sei hier auf die Aktivierung von Transposons hingewiesen (siehe nächster Abschnitt).

4.5.2 Epigenetische Kontrolle mobiler genetischer Elemente

Transposons (TEs, „transposable elements“) sind potenziell mobilisierbare genetische Elemente, die – so sie funktionell sind – ihre physische Position im Genom verändern können: Sie integrieren an anderer Stelle („cut and paste“) oder sich selbst replizierend auch an zusätzlichen Orten („copy and paste“). Sie sind seit der Entstehung eukaryontischer Organismen ein wichtiger Bestandteil ihrer Genome und gelten als treibende Kraft der Evolution (Kidwell/Lisch, 2000).

Auf verschiedenste Weise können funktionelle Transposons in neue genomische Loci¹³ inserieren (Lisch, 2013). Durch Integration in Gene, deren Promotoren oder in andere Regulationselemente kann die Expression von Genen gravierend verändert werden (Paszkowski/Grossniklaus, 2011). Zu den bekanntesten Beispielen durch Transposon-Aktivitäten verursachter Null-Mutationen – das heißt, die Funktion des betroffenen Gens wurde vollständig aufgehoben – gehören die Entstehung von weißen aus roten Rebsorten (Kobayashi et al., 2004) und die Entwicklung von kernlosen Apfelsorten (Yao et al., 2001). Darüber hinaus können neue Genfunktionen beispielsweise dadurch entstehen, dass durch die Insertion eines Transposons von einer unprozessierten mRNA alternative Splicing-Produkte generiert werden (Lisch, 2013).

An dieser Stelle sei aber nochmals darauf hingewiesen, dass nicht alle stabil vererbaren phänotypischen Veränderungen auf Transposon-Aktivitäten zurückzuführen sind. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten, die detaillierte Charakterisierungen von epigenetisch rekombinanten Inzuchtlinien („epigenetic recombinant inbred lines“, epiRILS)¹⁴ in *A. thaliana* beschreiben, weisen darauf hin, dass DNA-methylierungsinduzierte Epi-Mutationen, die sich auf phänotypische Eigenschaften (Blühzeitpunkt, Wurzellänge, Wachstumsgeschwindigkeit etc.) auswirken, in einem nicht unerheblichen Umfang an die nächsten Generationen weitergegeben werden (Roux et al., 2011; Latzel et al., 2012; Cortijo et al., 2014). Interessanterweise basierten die Epi-Mutationen in der

13 Locus bezeichnet die physische Position eines Gens auf einem Chromosom.

14 Rekombinante Inzuchtlinien (RILs) enthalten jeweils unterschiedliche Kombinationen der elterlichen Gene und sind reinerbig (homozygot) gezüchtet. Sie werden z. B. verwendet, um Genorte oder auch Genregionen zu identifizieren, die für die Ausprägung phänotypischer Eigenschaften verantwortlich sind (sog. QTLs = „quantitative trait loci“).

Regel nicht auf einer DNA-Methylierung einzelner Genorte (Einzel-Locus-Vererbung). Vielmehr waren zwei bis fünf der „quantitative trait loci“ (QTLs) für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps verantwortlich (multigenische Eigenschaften).

Um eine „evolutionäre Katastrophe“ zu verhindern, müssen allerdings fast alle funktionellen Transposons inaktiviert werden (dies gilt übrigens für alle höheren Lebewesen). Ohne eine ausgeglichene Balance zwischen aktiven und inaktiven Transposons würden diese „endogenen Mutagene“ früher oder später die genetische Information eines Organismus zerstören. Zu den Mechanismen, die zu lang- und zu kurzfristigen Inaktivierungen von Transposons führen, zählen unter anderem Chromatin-Modifikationen und die DNA-Methylierung (Ito et al., 2011; Fultz et al., 2015). Pflanzliche Genome bestehen bis zu 85 % (Mais) aus Transposon-Sequenzen (SanMiguel, 1996), die unter normalen natürlichen Bedingungen durch epigenetische Mechanismen inaktiv vorliegen (Wassenegger, 2002; Fultz, 2015). Darüber hinaus sind – unabhängig von einer Inaktivierung durch Methylierung – aufgrund von Mutationen, je nach Art der Pflanze, nur noch wenige der vorhandenen Transposons funktionell, also in der Lage zu „springen“.

Die genaue Anzahl der im Genom vorhandenen funktionellen Transposons, die potenziell aktiviert werden können, ist für unsere Kulturpflanzen derzeit nicht bekannt. In Mais und Reis mag es noch eine Vielzahl an Transposons geben, die durch eine genomweite Modifikation von epigenetischen Markern aktiviert werden können. Diese Veränderungen können, wie vorangehend beschrieben, mithilfe von chemischen Substanzen oder durch Verwendung von Mutanten induziert werden. Untersucht man die Nachkommen der behandelten Pflanzen oder der gekreuzten Mutanten, werden sich zahlreiche Phänotypen finden lassen, die auf die Aktivität von Transposons und nicht auf direkte epigenetisch bedingte Veränderungen von Genexpressionsmustern zurückzuführen sind. Vergleichende Sequenzanalysen der Genome verschiedener Varianten können Aufschluss über neue Transposon-Integrationsorte geben. Sollten die betroffenen Gene in den Varianten gegenüber Wildtyp-Pflanzen differenzielle Expressionsmuster aufweisen, können gegebenenfalls Rückschlüsse gezogen werden, welche Gene für die Ausprägung der Phänotypen verantwortlich sind. Nach Verifizierung der Daten (z. B. durch RNAi-Experimente) könnten letztendlich Zuordnungen von Genfunktionen erfolgen. Sollten die generierten Varianten nicht direkt in die Zucht neuer Kulturpflanzen einbezogen werden können, so könnten die identifizierten Gene immer noch als Marker für die Präzisionszucht¹⁵ dienen.

¹⁵ Züchtungsmethode zur Entwicklung von neuen Sorten: Unter Nutzung genetischer Marker und moderner DNA-Analyseverfahren werden potenzielle Kreuzungspartner gezielt auf gewünschte genetische Eigenschaften hin untersucht. Auch „SMART Breeding“ („selection with markers and advanced reproductive technologies“) oder „marker assisted selection“ (MAS) genannt.

Mit der hier beschriebenen Strategie wird die Epigenetik genutzt, um eine „biologische Mutagenese“ von Pflanzen zu induzieren. Auch wenn in den Varianten und deren Nachkommen die meisten epigenetischen Marker wieder auf ihren Ursprungszustand zurückgesetzt werden (transiente epigenetische Modifikation), so bleiben die Integrationsorte der Transposons unverändert und somit können neue stabile Pflanzenlinien erzeugt werden. Ein deutlicher Nachteil dieser Technologie liegt darin, dass die induzierte Mutagenese ungerichtet ist und alle Variationen dem Zufallsprinzip unterliegen.

4.5.3 Epigenetische Kontrolle von Stresseffekten

Der zweite Ansatz, der indirekt auf epigenetische Variationen zurückgreift, beinhaltet die Erfassung von transienten epigenetischen Effekten, die durch Stress ausgelöst werden. Pflanzen reagieren auf Umweltfaktoren wie veränderte Licht- und Temperaturverhältnisse sowie auf belastende Stresssituationen, wie sie beispielsweise durch hohe Salzkonzentrationen oder Pathogenbefall ausgelöst werden können (Dorantes-Acosta et al., 2012; Kim et al., 2015). Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass die Reaktionen der Pflanzen oft mit einer differenziellen Expression von mehreren hundert Genen einhergehen können. Die veränderte Regulation der meisten dieser Gene beruht aber wiederum auf sekundären Mechanismen. Als ein Beispiel solcher sekundärer Effekte sei hier nur die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TFs) genannt (Lauria/Rossi, 2011). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an definierte DNA-Abschnitte binden und darüber die Expression von Genen regulieren. Wenn Transkriptionsfaktoren bei veränderten Umwelt-/Stressbedingungen unmittelbar durch Modifizierung epigenetischer Markierungen aktiviert werden, können sie die Expression vieler Gene verstärken, deren epigenetischer Zustand selbst durch die äußeren Einflüsse nicht direkt beeinflusst wurde.

Fast alle der Umwelt-/Stress-bedingten epigenetischen Veränderungen werden nicht vererbt, sondern wieder zurückgesetzt, sobald die äußeren Bedingungen sich normalisiert haben (Paszkowski/Grossniklaus, 2011; Pecinka/Mittelsten Scheid, 2012). Diese Strategie hat den Vorteil, dass Umwelt-/Stress-induzierte Abwehrmaßnahmen auch dann noch sinnvoll für den Organismus sein können, wenn diese die Gesamtfitness beeinträchtigen und langfristig nachteilig wären. Die Reversibilität der epigenetischen Modifikationen bedeutet aber auch, dass epigenetische Veränderungen und deren Auswirkungen auf die Genexpression nur unter anhaltenden Umwelt-/Stressbedingungen identifiziert werden können. Darüber hinaus ist die Nichtvererbbarkeit ein Hemmschuh für die Pflanzenzüchtung. Dennoch lassen sich auch hier, wie bereits oben

beschrieben, differenziell exprimierte Gene identifizieren, die als Marker für die Präzisionszucht genutzt werden können.

4.5.4 Züchtung mithilfe epigenetischer Manipulationen: RdDM-Technologie

Eine Züchtungsstrategie, die epigenetische Veränderungen direkt nutzt, basiert auf einer gezielten De-novo-Methylierung von Genpromotoren. Hierfür werden mithilfe gentechnischer Methoden DNA-Sequenzen in pflanzliche Zellen eingebracht, die eine Haarnadelstruktur aufweisen. Werden diese Haarnadelstrukturen transkribiert, werden in den Zellen dsRNAs generiert, die Homologie zu Promotoren von gewünschten Zielgenen besitzen und eine RNA-dirigierte Methylierung der DNA bewirken. Durch die dsRNA-induzierte RdDM werden die Promotoren an symmetrischen und asymmetrischen Positionen spezifisch methyliert (Dalakouras et al., 2009), wodurch die Promotoraktivität und damit die Expression der entsprechenden Gene inhibiert werden kann.¹⁶ Nach Selbstungen solcher transgenen Linien entstehen unter anderem auch Nachkommen, die die dsRNA-transkribierenden Transgene verloren haben (Auskreuzen). Bei diesen Nachkommen bleibt aber die symmetrische CG-Methylierung in der Regel erhalten und kann über mehrere Generationen an die Nachkommen weitergegeben werden (Jones et al., 2001; Lunerová-Bedrichová et al., 2008; Dalakouras et al., 2012).

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass Pflanzen, die nach dem hier vorgestellten Verfahren generiert wurden, derzeit unter die Regularien für gentechnisch veränderte Organismen (GVO) in der EU fallen.¹⁷ Eine europäische Expertenkommission („New Techniques Working Group“)¹⁸ veröffentlichte kürzlich eine Regulierungsempfehlung für eine Reihe neuartiger Züchtungstechniken – unter anderem die RdDM-Technologie. Es galt zu klären, wie Pflanzen, die mithilfe dieser neuen Technologien gezüchtet werden, jeweils einzustufen sind und ob sie möglicherweise, wie von der Expertenkommission empfohlen, aus dem Geltungsbereich der GVO-Regularien herausgenommen werden sollten.

Wie auch immer die Entscheidung der Europäischen Kommission sein wird, so sollte darauf hingewiesen sein, dass die RdDM-Methode einigen Einschränkungen unterliegt. Es können beispielsweise nicht alle Promotoren durch Methylierung inaktiviert werden. Selbst wenn sie in Anwesenheit des RdDM-auslösenden Transgens inaktiviert werden, heißt dies noch nicht, dass die Inaktivierung auch vererbt werden kann. Ein

¹⁶ Siehe auch Patentschrift „Method for the production of a transgene-free plant with altered methylation pattern“, WO 2010066343 A1.

¹⁷ Richtlinien 2001/18/EC und 2009/41/EC.

¹⁸ http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm [13.07.2016].

leicht nachvollziehbares Beispiel ist gegeben, wenn die Sequenz eines Promotors keine oder nur sehr wenige CG-Paare besitzt. In diesem Fall wäre seine Inaktivierung auf die RdDM-vermittelte asymmetrische Methylierung zurückzuführen, die nach der Auskreuzung des RdDM-Auslösers nicht an die nächste Generation weitergegeben wird.

Dennoch kann die RdDM-Technologie genutzt werden, um Gene in Pflanzen stillzulegen. Denkbare züchtungsrelevante Anwendungen wären beispielsweise die Inaktivierung von Genen, die die Fruchtreifung beeinflussen oder deren Produkte Allergien auslösen. Wie oben beschrieben, ist die Identifikation von Genen, die unter natürlichen Gegebenheiten aufgrund ihrer Methylierung und/oder Chromatin-Struktur im Promotorbereich inaktiv vorliegen, durch die Applikation von chemischen Substanzen oder die Charakterisierung von Mutanten relativ leicht zu bewerkstelligen. Dies steht im Gegensatz zur Auffindung von Genen, die natürlicherweise unmethyliert und in euchromatischen Strukturen eingebettet vorliegen, aber durch De-novo-Methylierung deaktiviert werden könnten. Es ist deshalb erforderlich, das Potenzial der RdDM-Technologie für Gene individuell empirisch auszutesten. Dazu gehört sowohl die Analyse von Promotoren, um herauszufinden, welche Regionen gegenüber einer De-novo-Methylierung oder einer Geninaktivierung besonders sensitiv sind, wie auch die Überprüfung einer möglichen Vererbbarkeit der Inaktivierung der entsprechenden Gene.

4.5.5 Züchtung mithilfe epigenetischer Marker: Genome Editing

Auch wenn nicht alle Verfahren epigenetischer Manipulationen wegen ihrer Reversibilität geeignet sind, neue Sorten zu züchten, so können sie dennoch helfen, Genfunktionen aufzuklären. Wie oben bereits beschrieben, können Rückschlüsse gezogen werden, welche Gene für die Ausprägung von Phänotypen verantwortlich sind. Diese Kenntnisse sind nicht nur für die Präzisionszucht (siehe oben) unabdingbar, sondern können heutzutage vor allem für das sogenannte „genome editing“ eingesetzt werden. Unter „genome editing“ versteht man innovative molekularbiologische Verfahren, mit denen Mutationen punktgenau gesetzt werden können. Zu den bedeutendsten Verfahren, die heute zur Anwendung kommen, gehören „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR)/Cas, „transcription activator-like effector nucleases“ (TALEN) und „zinc finger nucleases“ (ZFN) (Doudna/Charpentier, 2014; Boch, 2011; Townsend et al., 2009). Mit allen drei Verfahren könnten genomische Sequenzen, die durch epigenetische Manipulationen als interessante Marker identifiziert wurden, editiert werden. Durch den Austausch oder die Deletion von nur einem Nukleotid innerhalb der Gensequenz ließe sich die entsprechende Genfunktion inhibieren. Anderseits können mit diesen Verfahren auch größere Genabschnitte eingefügt (Insertion) oder

entfernt (Deletion) werden. Es wäre somit machbar, Promotersequenzen, die epigenetisch regulierbar sind, durch solche zu ersetzen, die dies nicht sind.

Nicht unerwähnt sollte die Möglichkeit bleiben, dass Gene, die bei epigenetischen Regulationen eine wichtige Funktion haben (z. B. DNA-Methylasen), mithilfe der „genome editing“-Systeme abgeschaltet werden können. Bisher war dies nur durch ungerichtete Mutationsverfahren wie chemische Mutagenese oder T-DNA-Insertionen möglich. Dabei liegt die Trefferquote für ein bestimmtes Gen, in Abhängigkeit der Genomgröße, bei einer unter 100.000 Pflanzen. Zudem liegt die Mutation dann üblicherweise nur in einem Allel vor, sodass die Produktion homozygoter Linien erforderlich ist. Alle drei Verfahren des „genome editing“ lassen sich theoretisch auf alle Pflanzenarten anwenden.

4.6 Fazit

Zusammenfassend kann zunächst festgestellt werden, dass die Bedeutung epigenetischer Genregulationen lange unterschätzt wurde. Heute weiß man, dass sie wichtige Aufgaben beim Imprinting, bei der Inaktivierung elterlicher Chromosomen, bei der Ausbildung von Heterochromatin und beim „In-Schach-Halten“ von Transposons übernehmen. Wir lernen erst langsam die Zusammenhänge zwischen Umwelteinflüssen, DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen zu verstehen. Aber gerade die Vielfältigkeit der Epigenetik eröffnet ein immenses Potenzial für die moderne Pflanzenzüchtung. Wie andere Organismen reagieren Pflanzen häufig nur zeitlich begrenzt auf bestimmte Auslöser wie beispielsweise auf biotische/abiotische Stresssituationen. Die Gene, die an diesen transienten Reaktionen beteiligt sind, können heute identifiziert werden, was die Möglichkeit eröffnet, sie entsprechend den gewünschten Anforderungen zu beeinflussen, sie zu inaktivieren oder ihre Expression zu verstärken.

4.7 Literatur

- Amoah, S. et al. (2012): A hypomethylated population of *Brassica rapa* for forward and reverse epigenetics. In: BMC Plant Biol 12:193.
- Ashapkin, V. V. et al. (2002): The gene for domains rearranged methyltransferase (DRM2) in *Arabidopsis thaliana* plants is methylated at both cytosine and adenine residues. In: FEBS Lett 532(3):367–372.
- Baubec, T. et al. (2009): Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. In: Plant J 57(3):542–554.
- Boch, J. (2011): TALEs of genome targeting. In: Nat Biotechnol 29(2):135–136.

- Cao, X. et al. (2003): Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. In: *Curr Biol* 13(24):2212–2217.
- Cortijo, S. et al. (2014): Mapping the epigenetic basis of complex traits. In: *Science* 343(6175):1145–1148.
- Cubas, P. et al. (1999): An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. In: *Nature* 401(6749):157–161.
- Dalakouras, A./Wassenegger, M. (2013): Revisiting RNA-directed DNA methylation. In: *RNA Biol* 10(3):453–455.
- Dalakouras, A. et al. (2012): Transgenerational maintenance of transgene body CG but not CHG and CHH methylation. In: *Epigenetics* 7(9):1071–1078.
- Dalakouras, A. et al. (2009): A hairpin RNA construct residing in an intron efficiently triggered RNA-directed DNA methylation in tobacco. In: *Plant J* 60(5):840–851.
- Dorantes-Acosta, A. E. et al. (2012): Biotic stress in plants: life lessons from your parents and grandparents. In: *Front Genet* 3:256.
- Dowen, R. H. et al. (2012): Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. In: *PNAS* 109(32):E2183–E2191.
- Doudna, J. A./Charpentier, E. (2014): The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science* 346(6213):1258096.
- Ebbs, M. L./Bender, J. (2006): Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. In: *Plant Cell* 18(5):1166–1176.
- Erdmann, R. M. et al. (2014): 5-Hydroxymethylcytosine is not present in appreciable quantities in *Arabidopsis* DNA. In: *G3 (Bethesda)* 5(1):1–8.
- Finnin, M. S. et al. (1999): Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. In: *Nature* 401(6749):188–193.
- Fire, A. et al. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391(6669):806–811.
- Fu, Y. et al. (2015): N6-Methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. In: *Cell* 161(4):879–892.
- Fultz, D. et al. (2015): Silencing of active transposable elements in plants. In: *Curr Opin Plant Biol* 27:67–76.
- Greer, E. L. et al. (2015): DNA Methylation on N6-adenine in *C. elegans*. In: *Cell* 161(4):868–878.
- Hauben, M. et al. (2009): Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. In: *PNAS* 106(47):20109–20114.
- Huettel, B. et al. (2006): Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. In: *EMBO J* 25(12):2828–2836.
- Huh, J. H. et al. (2008): Cellular programming of plant gene imprinting. In: *Cell* 132(5):735–744.
- Ito, H. et al. (2011): An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. In: *Nature* 472(7341):115–119.

- Jones, L. et al. (2001): RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. In: *Curr Biol* 11(10):747–757.
- Kawashima, T./Berger, F. (2014): Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. In: *Nat Rev Genet* 15(9):613–24.
- Kidwell, M. G./Lisch, D. R. (2000): Transposable elements and host genome evolution. In: *Trends Ecol Evol* 15(3):95–99.
- Kim, J. M. et al. (2015): Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. In: *Front Plant Sci* 6:114.
- Kobayashi, S. et al. (2004): Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. In: *Science* 304(5673):982.
- Kou, H. P. et al. (2011): Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). In: *J Plant Physiol* 168(14):1685–1693.
- Latzel, V. et al. (2012): Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. In: *Ann Bot* 110(7):1423–1428.
- Lauria, M./Rossi, V. (2011): Epigenetic control of gene regulation in plants. In: *Biochim Biophys Acta* 1809(8):369–378.
- Lisch, D. (2013): How important are transposons for plant evolution? In: *Nat Rev Genet* 14(1):49–61.
- Lister, R. et al. (2009): Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. In: *Nature* 462(7271):315–322.
- Lunerová-Bedrichová, J. et al. (2008): Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. In: *Plant J* 54(6):1049–1062.
- Manning, K. et al. (2006): A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. In: *Nat Genet* 38(8):948–952.
- Martin, A. et al. (2009): A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. In: *Nature* 461(7267):1135–1138.
- Mathieu, O. et al. (2007): Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. In: *Cell* 130(5):851–862.
- Matzke, M. A./Mosher, R. A. (2014): RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. In: *Nat Rev Genet* 15(6):394–408.
- Melamed-Bessudo, C./Levy A. A. (2012): Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in *Arabidopsis*. In: *PNAS* 109(16):E981–E988.
- Meyer, P. (2015): Epigenetic variation and environmental change. In: *J Exp Bot* 66(12):3541–3548.
- Mirouze, M. et al. (2012): Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in *Arabidopsis*. In: *PNAS* 109(15):5880–5885.
- Paszkowski, J./Grossniklaus, U. (2011): Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. In: *Curr Opin Plant Biol* 14(2):195–203.
- Pecinka, A. et al. (2010): Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 22(9):3118–3129.
- Pecinka, A./Mittelsten Scheid, O. (2012): Stress-induced chromatin changes: a critical view on their heritability. In: *Plant Cell Physiol* 53(5):801–808.

- Pinney, S. E. (2014): Mammalian Non-CpG Methylation: Stem cells and beyond. In: *Biology (Basel)* 3(4): 739–751.
- Regulski, M. et al. (2013): The maize methylome influences mRNA splice sites and reveals widespread paramutation-like switches guided by small RNA. In: *Genome Res* 23(10):1651–1662.
- Roux, F. et al. (2011): Genome-wide epigenetic perturbation jump-starts patterns of heritable variation found in nature. In: *Genetics* 188(4):1015–1017.
- SanMiguel, P. et al. (1996): Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. In: *Science* 274(5288):765–768.
- Shirane, K. et al. (2013): Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. In: *PLoS Genet* 9(4):e1003439.
- Soppe, W. J. et al. (2000): The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. In: *Mol Cell* 6(4):791–802.
- Stam, M. et al. (2002): Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *bl* locus is associated with paramutation. In: *Genes Dev* 16(15):1906–1918.
- Stroud, H. et al. (2014): Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. In: *Nat Struct Mol Biol* 21(1):64–72.
- Teixeira, F. K. et al. (2009): A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. In: *Science* 323(5921):1600–1604.
- Tittel-Elmer, M. et al. (2010): Stress-induced activation of heterochromatic transcription. In: *PLoS Genet* 6(10):e1001175.
- Townsend, J. A. et al. (2009): High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. In: *Nature* 459(7245):442–445.
- Tricker, P. J. et al. (2012): Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. In: *J Exp Bot* 63(10):3799–3813.
- Tsuchiya, T./Eulgem T. (2013): An alternative polyadenylation mechanism coopted to the *Arabidopsis* RPP7 gene through intronic retrotransposon domestication. In: *PNAS* 110(37):E3535–E3543.
- Wassenegger, M. (2002): Gene silencing-based disease resistance. In: *Transgenic Res* 11(6):639–653.
- Wassenegger, M. et al. (1994): RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. In: *Cell* 76(3):567–576.
- Xu, G. L./Walsh, C. P. (2014): Enzymatic DNA oxidation: mechanisms and biological significance. In: *BMB Rep* 47(11):609–618.
- Yamamuro, C. et al. (2014): Overproduction of stomatal lineage cells in *Arabidopsis* mutants defective in active DNA demethylation. In: *Nat Commun* 5:4062.
- Yao, J. et al. (2001): Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. In: *PNAS* 98(3):1306–1311.
- Yao, Y. et al. (2012): *ddm1* plants are sensitive to methyl methane sulfonate and NaCl stresses and are deficient in DNA repair. In: *Plant Cell Rep* 31(9):1549–1561.

- Zhang, G. et al. (2015): N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* 161(4):893–906.
- Zhang, H./Zhu, J. K. (2012): Active DNA demethylation in plants and animals. In: CSH Symp Quant Biol 77:161–173.
- Zheng, X. et al. (2013): Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. In: PLoS One 8(11):e80253.

